

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Gebrauchsmusterschrift**
10 **DE 296 24 210 U 1**

61 Int. Cl.7:
G 01 J 3/28
G 01 J 3/443
G 01 N 21/64
C 12 Q 1/02
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 296 24 210,1
67 Anmeldetag: 10. 12. 1996
aus Patentanmeldung: 96 94 4834.9
47 Eintragungstag: 23. 5. 2001
43 Bekanntmachung
im Patentblatt: 28. 6. 2001

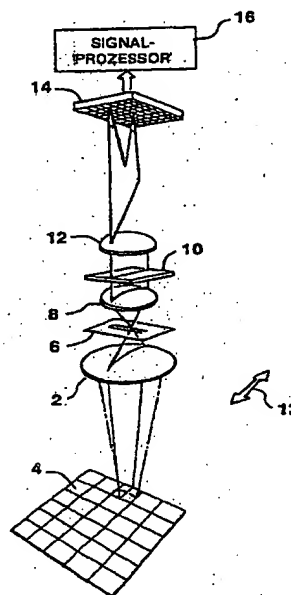
3x

DE 296 24 210 U 1

- 73 Inhaber:
Spectral Diagnostic Ltd., Migdal Haemek, IL
- 74 Vertreter:
Becker, Kurig, Straus, 80336 München

54 Vorrichtung zum gleichzeitigen Nachweis von multiplen Fluorophoren bei in situ Hybridisierung und Chromosomenanfärbung

- 57 Farbanzeigevorrichtung, aufweisend ein Bild aller Chromosomen oder Chromosomenabschnitte einer Zelle, wobei jedes der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren gefärbt ist, wobei das Bild die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.



DE 296 24 210 U 1

24 01 01

24.1.2001

Anmelder: Spectral Diagnostic Ltd.
Gebrauchsmuster 296 24 210.1
Unser Zeichen: 50409 DE

Vorrichtung zum gleichzeitigen Nachweis von multiplen Fluorophoren bei
in situ Hybridisierung und Chromosomenanfärbung

5 Gebiet und Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen eine Vorrichtung zum gleichzeitigen Nachweis von multiplen Fluorophoren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine spektrale Bioabbildungsvorrichtung, die auf das Nachweisen und Analysieren von fluoreszierenden *in situ* Hybridisierungsvorgängen gerichtet ist, bei denen zahlreiche Chromosomenanfärbungsmittel und/oder Locus-spezifische Sonden eingesetzt werden, und wobei jedes/jede mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren markiert ist, wobei die Vorrichtung sowohl bei räumlicher als auch bei spektraler Auflösung hochempfindlich ist und zum gleichzeitigen Nachweis von Dutzenden von Fluorophoren und/oder Kombinationen aus Fluorophoren fähig ist. Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kann daher für den Nachweis von fluoreszierend angefärbten, vollständigen Chromosomensätzen und/oder mehreren Loci einer Art, wie dem Menschen, und zum Bereitstellen eines vollständigen Farb-Karyotyps verwendet werden. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine Farbanzeigevorrichtung.

Ein Spektrometer ist ein Gerät, das dazu vorgesehen ist, Licht aufzunehmen, es in seine Wellenlängenkomponenten zu trennen (streuen) und das Lichtspektrum, d.h. die Lichtintensität, als Funktion seiner Wellenlänge, zu erfassen. Ein Abbildungsspektrometer sammelt einfallendes Licht von einer Szene und erfasst davon die Spektren von jedem Pixel (d.h. Bildelement). Spektroskopie ist ein gut bekanntes, analytisches Instrument, das seit Jahrzehnten in Wissenschaft und Industrie verwendet wird, um Materialien und Verfahren basierend auf den spektralen Signaturen der chemischen Bestandteilen zu charakterisieren. Die physikalische Grundlage der Spektroskopie ist die Wechselwirkung von Licht mit Materie. Spektroskopie ist gewöhnlich die Erfassung von Lichtintensität, die aus einer Probe als Funktion der Wellenlänge bei hoher spektraler Auflösung, jedoch ohne räumliche Information emittiert, übertragen, gestreut oder reflektiert wird.

30 Spektrale Abbildung, die andererseits eine Kombination aus hochauflösender Spektroskopie und hochauflösender Abbildung (d.h. räumlicher Information) darstellt, wurde bisher nicht zum Analysieren von biologischen Proben verwendet. Die nächst kommende bisher beschriebene Arbeit betrifft entweder das Erhalten von räumlich hochaufgelöster Information einer biologischen Probe, die bislang nur begrenzte, spektrale Information bereitstellt, wenn

DE 296 24 210 U1

24.01.01

Bandfiltern durchgeführt wird [siehe Andersson-Engels *et al.*, Proceedings of SPIE-Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy, 1205 (1990), 179-189] oder alternativ das Erhalten von hoher spektraler Auflösung (beispielsweise ein vollständiges Spektrum), die bislang bei der räumlichen Auflösung auf eine kleine Anzahl von Punkten der Probe begrenzt ist oder bei der über die ganze Probe der Durchschnitt genommen wird [siehe beispielsweise US-P-4,930,516, an Alfano *et al.*].

Wie nachstehend ausführlichst beschrieben, ist das Kombinieren von Spektroskopie und Abbildung für verschiedene, biologische Forschungsanwendungen und medizinische Anwendungen nützlich und dies wird nachstehend als spektrales Bio-Abbilden bezeichnet. Ein Beispiel für die Nützlichkeit von spektralem Bio-Abbilden betrifft den Nachweis von spezifischen, zellulären Bestandteilen (beispielsweise Proteinen, Nucleinsäuresequenzen, etc.), nachdem sie mit fluoreszierenden Sonden markiert wurden (d.h. mit einem Zeichen versehen wurden). In dieser Richtung kann spektrales Abbilden verwendet werden, um mehrere Fluorophore gleichzeitig in einer Erfassung zu identifizieren und zuzuordnen. Die inhärent hohe, spektrale Auflösung der spektralen Abbildung der vorliegenden Erfindung ist tatsächlich zum „AusSORTIEREN“ (sorting out) fluoreszierender Sonden (oder anderer, chemischer Bestandteile) mit überlappenden Spektren ideal geeignet.

Begrifflich besteht ein spektrales Bio-Abbildungssystem aus (1) einem Erfassungssystem und (2) einer Analysesoftware. Das Erfassungssystem schließt alle optischen und elektronischen Bestandteile und die Art, in der die Probe beleuchtet wird (beispielsweise Auswahl der Lichtquelle), die Art und Weise der Erfassung (beispielsweise Fluoreszenz) und ebenso auch die am besten zum Gewinnen der gewünschten Ergebnisse aus der Erfassung geeignete Kalibrierung ein. Die Analysesoftware schließt die ganze Software und mathematische Algorithmen mit ein, die nötig sind, um die wichtigen Ergebnisse auf sinnvolle Weise zu analysieren und anzuzeigen. Spektrale Abbildung wurde seit Jahrzehnten in dem Bereich der Fernerkundung verwendet, um wichtige Einblicke in die Studien der Erde und anderer Planeten durch das Identifizieren kennzeichnender, spektraler Absorptionseigenschaften bereitzustellen. Die hohen Kosten, die Größe und die Gestaltung von spektralen Fernerkundungsabbildungssystemen (beispielsweise Landsat, AVIRIS) haben jedoch ihre Verwendung auf Luft und Satelliten gestützte Anwendungen beschränkt [siehe, Maymon and Neeck, Proceedings of SPIE - Recent Advances in Sensors, Radiometry and Data Processing for Remote Sensing, 924 (1988), 10-22; Dozier, Proceedings of SPIE - Recent Advances in Sensors, Radiometry and Data Processing for Remote Sensing, 924 (1988), 23-30].

Es gibt drei Grundtypen von spektralen Streuvorrichtungen, die für ein spektrales Bio-Abbildungssystem in Erwägung gezogen werden können: (i) spektrales Gitter, (ii) spektrale Filter und (iii) interferometrische Spektroskopie. Wie nachstehend beschrieben, ist die Letztgenannte die am besten geeignete, um die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung zu bilden.

DE 295 24 210 U1

Bei einem auf einem Gitter (d.h. Monochromator) basierenden System, das ebenfalls als Abbildungsspektrometer des Spalttyps bekannt ist, wie beispielsweise das DILOR-System: [siehe Valisa *et al.*, presentation at the SPIE Conference European Medical Optics Week, BIOS Europe'95, Barcelona, Spanien (Sep. 1995)] stellt nur eine Achse einer CCD-(charge coupled device, Ladungstransferspeicher)-Detektoranordnung (die räumliche Achse) reale, abbildende Daten bereit, während eine zweite (spektrale) Achse zum Probennehmen der Intensität des durch das Gitter als Funktion der Wellenlänge gestreuten Lichts verwendet wird. Das System weist ebenfalls einen Spalt in einer ersten, im Brennpunkt stehenden Ebene auf, die das Sichtfeld zu einem bestimmten Zeitpunkt auf eine Linie von Pixeln beschränkt. Daher kann eine vollständige Abbildung nur nach dem Scanning des Gitters oder des eintreffenden Strahl in einer zu der spektralen Achse der CCD parallelen Richtung in einem Verfahren erhalten werden, das in der Literatur als Linienscanning bekannt ist. Die Unfähigkeit, die zweidimensionale Abbildung sichtbar zu machen, bevor die ganze Erfassung abgeschlossen ist, macht es unmöglich vor dem Ausführen einer Erfassung, einen gewünschten Bereich von Interesse innerhalb des Sichtfelds zu wählen und/oder den Systembrennpunkt, die Belichtungsdauer, etc. zu optimieren. Auf Gittern basierende, spektrale Abbildungsvorrichtungen sind für Fernerkundungsanwendungen in Gebrauch, da ein über der Erdoberfläche fliegendes Flugzeug (oder Satellit) dem System einen natürlichen Linienscanning-Mechanismus bereitstellt.

Es sollte weiter festgestellt werden, dass Abbildungsspektrometer des Spalttyps einen bedeutenden Nachteil aufweisen, da die meisten der Pixel eines Rahmens zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht erfasst werden, selbst wenn die nach vorne gerichteten, optischen Bestandteile des Instruments einfallendes Licht tatsächlich von all denen gleichzeitig sammeln. Das Ergebnis ist, dass entweder eine relativ große Erfassungszeit erforderlich ist, um die nötige Information mit einem bestimmten Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten oder dass das Signal/Rausch-Verhältnis (Empfindlichkeit) bei einer bestimmten Erfassungsdauer wesentlich verringert ist. Weiterhin erfordern die spektralen Abbildungsvorrichtungen des Spalttyps Linienscanning, um die nötige Information für die ganze Szene/das ganze Bild zu sammeln, was Ungenauigkeiten in die somit erhaltenen Ergebnisse einführen kann.

Auf Filtern basierende, spektrale Streuvorrichtungen können weiter in diskrete und stimbare Filter eingeteilt werden. Bei diesen Typen von Abbildungsspektrometern wird die spektrale Abbildung durch Filtern der Strahlung für alle Pixels der Szene gleichzeitig bei einer unterschiedlichen Wellenlänge zu einem Zeitpunkt durch aufeinander folgendes Einfügen von Schmalbandfiltern in den optischen Weg oder durch elektronisches Scanning der Bänder unter Verwendung von akusto-optischen, stimbaren Filtern (AOTF) oder flüssigkristallinen, stimbaren Filter (LCTF) gebildet, siehe nachstehend. Ähnlich zu den Abbildungsspektrometern des Spalttyps, die, wie vorstehend beschrieben, mit einem Gitter ausgestattet sind, wird während der Verwendung von auf Filtern basierenden, spektralen Streuvorrichtungen der größte Teil der

24.01.01

Strahlung zu einer bestimmten Zeit abgewiesen. Tatsächlich ist die Erfassung der vollständigen Abbildung bei einer spezifischen Wellenlänge möglich, weil alle Photonen außerhalb der augenblicklichen, gemessenen Wellenlänge zurückgeworfen werden und die CCD nicht erreichen. Der Empfindlichkeitsvorteil, den interferometrische Spektroskopie gegenüber Filter- und Gitterverfahren aufweist, ist in der Technik als multiplexer Vorteil oder Fellgett-Vorteil bekannt.

Stimmbare Filter, wie beispielsweise AOTFs und LCTFs, weisen keine bewegbaren Teile auf und können auf jede einzelne Wellenlänge in dem spektralen Bereich der Vorrichtung abgestimmt werden, bei der sie durchgeführt werden. Ein Vorteil der Verwendung von stimmbaren Filtern als ein Streuverfahren für spektrale Abbildung ist ihr beliebiger Wellenlängenzugriff, d.h. die Fähigkeit, die Intensität einer Abbildung bei einer Anzahl von Wellenlängen in jeder gewünschten Sequenz ohne die Verwendung von Filterrädern zu erfassen. AOTFs und LCTFs weisen jedoch die Nachteile auf von (i) einem begrenzten spektralen Bereich (gewöhnlich $\lambda_{\max} = 2\lambda_{\min}$), während die ganze andere Strahlung, die aus diesem spektralen Bereichs fällt, abgeblockt werden muß, (ii) Temperaturempfindlichkeit, (iii) schlechter Durchlässigkeit, (iv) Polarisationsempfindlichkeit und (v) einem Verschiebungseffekt der Abbildung während des Wellenlängenscannings im Fall von AOTFs.

Alle diese Typen von auf Filtern oder stimmbaren Filtern basierenden Systemen wurden über die Jahren in der spektralen Abbildung wegen ihrer Beschränkungen bei spektraler Auflösung, geringer Empfindlichkeit, Fehlen von leicht anwendbaren und hochentwickelten Software-Algorithmen zur Interpretation und Anzeige der Daten bei irgendeiner Anwendung nicht erfolgreich und ausgiebig verwendet.

Ein Verfahren und ein Gerät zur spektralen Analyse von Abbildungen, die Vorteile bei den vorstehenden Beziehungen aufweisen, wurde in der US-P-08/392,019 von Cabib *et al.*, eingereicht am 21. Februar, 1995, nun US-P-5,539,517, erteilt am 23. Juli, 1996, die unter Bezugnahme aufgenommen wird, als wäre sie hier vollständig offenbart worden, offenbart, dem die Aufgabe zugrunde lag, ein Verfahren und ein Gerät für spektrale Analyse von Abbildungen bereitzustellen, das, verglichen mit den herkömmlichen Abbildungsspektrometer des Spalt- oder Filtertyps, all die Information besser nutzt, die von dem gesammelten, einfallenden Licht zugänglich ist, um im Wesentlichen die erforderlichen Rahmenzeit zu verringern und/oder das Signal/Rausch-Verhältnis zu erhöhen und kein Linien-Scanning einschließt. Gemäß dieser Erfindung wird ein Verfahren zum Analysieren einer optischen Abbildung einer Szene bereitgestellt, um die spektrale Intensität jedes Pixels davon durch Sammeln einfallenden Lichts von der Szene zu bestimmen; Durchgehen des Licht durch ein Interferometer, das modulierte Licht emittiert, das einem vorbestimmten Satz von Linearkombinationen der spektralen Intensität des vorn jedem Pixel emittierten Licht entspricht; Fokussieren des von dem Interferometer emittierten Lichts auf einer Detektoranordnung, Scanning der optischen Wegdifferenz (optical

DE 295 24 210 U1

path difference, OPD), die in dem Interferometer für alle Pixels unabhängig und gleichzeitig erzeugt wird und Verarbeiten des Outputs der Detektoranordnung (der Interferogramme von allen Pixels getrennt), um die spektrale Intensität eines jeden Pixels davon zu bestimmen. Dieses Verfahren kann durch die Nutzung von verschiedenen Typen von Interferometern betrieben werden, wobei die OPD variiert wird, um die Interferogramme durch Bewegen des ganzen Interferometers, eines Elements innerhalb des Interferometers oder des Einfallswinkel der eintreffenden Strahlung aufzubauen. In all diesen Fällen werden die Interferogramme für alle Pixels der Szene vervollständigt, wenn der Scanner einen Scan vervollständigt. In Übereinstimmung mit den vorstehenden Eigenschaften stehende Geräte unterscheiden sich von herkömmlichen Abbildungsspektrometern des Spalt- und Filtertyps durch Nutzen eines wie vorstehend beschriebenen Interferometers und begrenzen dadurch nicht die gesammelte Energie mit einer Öffnung oder einem Spalt oder die eintreffende Wellenlänge mit Schmalbandinterferenz oder stimbaren Filtern und erhöhen dadurch im Wesentlichen den Gesamtdurchsatz des Systems. Damit nützen auf Interferometern basierende Geräte die gesamte, durch das einfallende Licht der zu analysierenden Szene verfügbare Information besser und verringern dabei im Wesentlichen die Erfassungsdauer und/oder erhöhen das Signal/Rausch-Verhältnis (d.h. die Empfindlichkeit). Man ziehe beispielsweise das in John B. Wellman, Imaging Spectrometers for Terrestrial and Planetary Remote Sensing, SPIE Proceedings, Vol.750 (1987), 140 beschriebene "Wischer-Besen"-Design in Erwägung. Man lasse n die Anzahl der Detektoren in der linearen Anordnung, $m \times m$ die Anzahl der Pixel in einem Rahmen und T die Rahmenzeit sein. Die auf jeden Pixel verbrauchte Gesamtzeit in einem Rahmen, die über alle Detektoren der Anordnung summiert wird, beträgt nT/m^2 . Durch Verwenden der gleichen Anordnungsgröße und dem gleichen Rahmenverhältnis bei einem gemäß der in der US-P-08/392,019 beschriebenen Verfahren beträgt die verbrauchte, über alle Detektoren auf einem besonderen Pixel summierte Zeit ebenfalls nT/m^2 . Während jedoch bei dem herkömmlichen Gitterverfahren die Energie, die durch jeden Detektor zu jedem Zeitpunkt wahrgenommen wird, in der Größenordnung von $1/n$ der Gesamten liegt, da die Auflösung der Wellenlänge $1/n$ des Abstands beträgt, liegt bei einem gemäß der US-P-08/392,019 beschriebenen Verfahren die Energie in der Größenordnung von 1, da die modulierende Funktion eine oszillierende Funktion (beispielsweise sinusförmig (Michelson) oder eine ähnliche Funktion wie eine kleine Finesse aufweisende Airy-Funktion mit Fabry-Perot) ist, deren Durchschnitt über einen langen OPD-Bereich 50% beträgt. Basierend auf der Standardbehandlung des Fellgett-Vorteils (oder multiplexen Vorteils), der in interferometrischen Lehrbüchern beschrieben wird [siehe beispielsweise, Chamberlain, The principles of interferometric Spectroscopy, John Wiley and Sons (1979) 16-18 und 263], ist es möglich zu zeigen, dass erfindungsgemäße Vorrichtungen Signal/Rausch-Verhältnisse bei Erfassungen aufweisen, die um den Faktor $n^{0.5}$ in den Fällen der Rauschbegrenzungen verbessert sind, bei denen das Rauschniveau unabhängig von dem Signal (System- oder Hintergrundrauschen begrenzte Situationen) und um die Quadratwurzel des

24.01.01

Verhältnisses von dem Signal bei einer einzelnen Wellenlänge zu dem durchschnittlichen Signal bei Wellenlängen mit schmalen Peak in dem Spektralbereich in den Fällen, bei denen die Begrenzung aufgrund von Photonen-Signalrauschen vorliegt. Damit werden bei der gemäß der US-P-08/392,019 beschriebenen Erfindung alle erforderlichen OPDs gleichzeitig für alle die

5 Pixel der Szene gescannt, um die gesamte, zum Rekonstruieren des Spektrums erforderliche Information zu erhalten, so dass die spektrale Information gleichzeitig mit der Abbildungsinformation gesammelt wird. Die Erfindung kann mit vielen, unterschiedlichen optischen Konfigurationen, wie beispielsweise einem Teleskop zur Fernerkundung, einem Mikroskop für Laboranalysen, Faseroptiken für industrielle Überwachungen und medizinische Abbildung, Diagnose,

10 Therapie und anderes verwendet werden.

In einer weiterführenden Anmeldung (U.S. 08/571,047 an Cabib *et al.*, übermittelt am 12. Dezember, 1995, die unter Bezugnahme aufgenommen wird, als wäre sie hier vollständig offenbart) war die Aufgabe, spektrale Abbildungsverfahren für biologische Forschung, medizinische Diagnostik und Therapie bereitzustellen, deren Verfahren verwendet werden können, um

15 räumliche Organisation (beispielsweise Verteilung) nachzuweisen und zelluläre und natürliche, gewerbliche Bestandteile, Strukturen, Organe und verwaltete Komponenten, wie angehängte Proben (beispielsweise fluoreszierende Sonden und Inhaltsstoffe unter Verwendung von Lichttransmission, -reflektion und -streuung und Fluoreszenzemissionstrategien mit hoher räumlicher und spektraler Auflösung zu quantifizieren. In der US-P-08/571,047 wurde die

20 Verwendung des spektralen Abbildungsgerätes, das in der U.S.-P-08/392,019 zur fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung der Interphase bei so vielen wie sechs Loci-spezifischen Sonden (jeder Locus ist auf einem anderem Chromosom angeordnet) beschrieben wird, als auch zusätzliche biologische und medizinische Anwendungen durchgeführt.

Spektrale Bio-Abbildungssysteme sind bei potentiell allen Anwendungen nützlich, bei

25 denen feine, spektrale Differenzen zwischen chemischen Bestandteilen bestehen, deren räumliche Anordnung und Organisation innerhalb einer Abbildung von Interesse sind. Die Erfassung kann unter Verwendung jedes theoretischen, optischen Systems, das an dem in der US-P-08/392,019 beschriebenen System befestigt ist, ausgeführt werden, beispielsweise mit einem Fluoreszenz-Mikroskop kombiniert mit verwalteten, fluoreszierenden Fluorophoren oder

30 Kombinationen von Fluorophoren.

Fluoreszenzmessungen können mit jedem Standardfilterwürfel (bestehend aus einer Filterbarriere, einem Erregerfilter und einem dichroitischen Spiegel), jedem kundengebundenen Filterwürfel oder Kombinationen von Filterwürfeln für spezielle Anwendungen gemacht werden, vorausgesetzt, dass die Emissionsspektren innerhalb des spektralen Bereich der System-

35 empfindlichkeit fallen.

Einer der größten Verdienste des menschlichen Genomprojects (HGP) war die Isolation einer großen Anzahl an Nukleinsäuresonden für Krankheitsgene und andere Chromosombereiche

DE 298 24 210 U1

24 210 11

und -strukturen. Dieses hat das Interesse bei DNA-Diagnosen stimuliert, nachdem die Anzahl und Typen der Tests, die entwickelt werden können, von diesen Sonden abhängt. In den letzten Jahren gab es ein besonders Interesse an fluoreszierender *in situ* Hybridisierung (FISH), die das Verfahren zum Markieren mit einem fluoreszierenden Teil ist, der mit einem spezifischen, zu einem untersuchten Chromosomenbereich (hierin allgemein als Sonde bezeichnet) komplementären Nukleinsäuremolekül verbunden ist, gefolgt von der Veranschaulichung der fluoreszierenden Komponente durch Fluoreszenzmikroskopie.

Es gibt einen klaren Trend zum Einsetzen der FISH-Technologie im klinischen Bereich parallel zu ihrem traditionellen Einsatz in Labors der Grundlagenforschung. FISH kann als ein fortgeschrittener Ansatz der Cytogenetik betrachtet werden und es ist klar, dass die Informationsmenge über Chromosomen, die durch FISH gewonnen werden kann, diejenige weit hinter sich läßt, die von Standard-Karyotypisierung durch DNA-Bandenfärbungsverfahren erhalten wird. Zusätzlich kann Information zur Diagnose unter Verwendung derartiger Techniken wie Interphase-Cytogenetik viel schneller gewonnen werden, verglichen mit klassischer (Metaphase) Cytogenetik.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine FISH-Abbildungsanordnung bereitgestellt, die zum gleichzeitigen Erstellen von Fluoreszenzspektren von allen Pixels aus einem Sichtfeld eines Fluoreszenzmikroskops und zum gleichzeitigen Nachweisen der Anordnung von Dutzenden von Sonden in einer Messung fähig ist. In Verbindung mit der Zugänglichkeit von chromosomenspezifischen Sonden (beispielsweise Chromosomenfärbem) und neuen Markierungsstrategien ist die Vorrichtung fähig, einen FISH-Karyotypen zu erzeugen, wobei jedes Chromosom mit einer unterschiedlichen Farbe (beispielsweise 24 unterschiedliche Farben für einen menschlichen, männlichen Karyotypen, 23 für einen weiblichen) angefärbt ist. Dieses Verfahren führt zu einem extrem hohen Probendurchsatz und erlaubt die Analyse von einer im Wesentlichen unbegrenzten Anzahl von Sonden.

Damit gibt es einen weithin bestehenden Bedarf nach einer spektralen Abbildungsanordnung zum Nachweisen und Analysieren fluoreszierender *in situ* Hybridisierungen, die zahlreiche Chromosomenanfärbungsmittel und/oder Locus-spezifische Sonden, die alle mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren markiert sind, zum Nachweisen mit Fluoreszenzfärbstoffen angefärbter, vollständiger Chromosomensätze und/oder multiplen Loci von Arten, wie dem Menschen, einsetzt, und es wäre sehr vorteilhaft etwas derartiges zu haben.

35 Zusammenfassung der Erfindung

Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Farbanzeigevorrichtung bereitgestellt, die ein Bild aller Chromosomen oder Chromosomenabschnitte einer Zelle

DE 296 24 210 11

aufweist, wobei jedes der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren gefärbt ist, wobei das Bild die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.

10 Ferner wird gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung eine Farbanzeigevorrichtung bereitgestellt, die ein Bild der in einer Zelle vorliegenden Chromosomen aufweist, wobei jedes der Chromosomen mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren gefärbt ist, wobei das Bild die Chromosomen in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.

15 Ferner wird erfindungsgemäß eine Farbanzeigevorrichtung bereitgestellt, die ein Bild aller in einer Zelle vorliegenden Chromosomen oder Chromosomenabschnitte aufweist, wobei das Bild die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.

20 Darüberhinaus wird eine Farbanzeigevorrichtung bereitgestellt, die ein Bild aller in einer Zelle vorliegenden Chromosomen aufweist, wobei das Bild die Chromosomen in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.

25 Sodann wird eine spektrale Bioabbildungsvorrichtung gemäß der Erfindung bereitgestellt, die aufweist : eine Einrichtung zum Bereitstellen einer Probe mit allen Chromosomen oder Chromosomenabschnitten einer Zelle, wobei die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte hybridisiert sind mit einer Gruppe von Chromosomfarben, wobei jede Farbe eine Gruppe von Nukleinsäuresonden aufweist, die mit einem Fluorophor oder einer Kombination von
30 Fluorophoren markiert sind, wobei mindestens eine Farbe für jeden Chromosomentyp vorhanden ist und jede Farbe ein unterschiedliches Fluoreszenzspektrum aufweist; eine Einrichtung zum Betrachten der Probe in Form eines Fluoreszenzmikroskops, wobei das Fluoreszenzmikroskop optisch verbunden ist mit einem bildgebenden Spektrometer, wobei das Fluoreszenzmikroskop und das bildgebende Spektrometer dazu dienen, ein Spektrum jedes Pixels der Probe zu erhalten,
35 eine Einrichtung zum Sammeln einfallenden Lichtes gleichzeitig von allen Pixeln der Probe unter Verwendung einer kollimierenden Optik; eine Einrichtung zum Leiten des einfallenden, kollimierten Lichts durch ein Interferometersystem, das eine Anzahl von Elementen aufweist, so

24.01.01

daß das Licht zuerst aufgeteilt wird in zwei kohärente Strahlen, die sich in unterschiedlichen Richtungen innerhalb des Interferometers bewegen und sodann die zwei kohärenten Strahlen rekombiniert werden, um miteinander zu interferieren, um einen ausgehenden Lichtstrahl zu bilden; wobei der ausgehende Lichtstrahl geleitet wird durch ein fokussierendes optisches System, welches den austretenden Lichtstrahl auf einen Detektor mit einem zweidimensionalen Feld von Detektorelementen fokussiert, so daß zu jedem Zeitpunkt jedes der Detektorelemente das Bild ein und desselben Pixels der Probe für die gesamte Zeitdauer der Messung erhält, so daß das reale Bild der Zellkerne auf der Ebene des Detektorfeldes stationär ist und zu jeder Zeit während der Messung das Bild sichtbar und erkennbar bleibt und so daß jedes der Detektorelemente ein Signal erzeugt, das eine bestimmte Linearkombination der von dem Pixel mit unterschiedlichen Wellenlängen ausgesandten Lichtintensität ist, wobei die Linearkombination eine Funktion der optischen Wegdifferenz ist; eine Einrichtung zum Drehen oder Verschieben eines oder mehrerer Elemente des Interferometersystems, so daß die optische Wegdifferenz zwischen den zwei kohärenten Strahlen, die durch das Interferometersystem erzeugt werden, gleichzeitig für alle Pixels der Probe abgetastet wird; und eine Einrichtung zum Aufzeichnen von Signalen jedes der Detektorelemente als Funktion der Zeit unter Verwendung einer Aufzeichnungseinrichtung, um einen ersten spektralen Datenwürfel zu bilden; und eine Einrichtung zum Interpretieren des ersten spektralen Datenwürfels unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus, wodurch ein Bild geliefert wird, das die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zeigt, wobei jede der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte einer Farbe gemäß dessen Fluoreszenzspektrum zugeordnet ist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ferner eine spektrale Abbildungsvorrichtung bereitgestellt, die auf das Nachweisen und Analysieren von fluoreszierenden *in situ* Hybridisierungen ausgerichtet ist, die zahlreiche Chromosomenanfärbungsmittel und/oder Loci spezifische Sonden einsetzen, wobei jede mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination aus Fluorophoren markiert ist, wobei die Vorrichtung sowohl bei räumlicher als auch bei spektraler Auflösung hochempfindlich ist und zum gleichzeitigen Nachweis von Dutzenden von Fluorophoren und/oder Kombinationen aus Fluorophoren fähig ist; daher kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung für den Nachweis von fluoreszierend angefärbten, vollständigen Chromosomensätzen und/oder mehrfacher Loci von einer Art, wie der menschlichen, und zum Bereitstellen eines Farb-Karyotyps verwendet werden.

Gemäß weiterer Merkmale in den bevorzugten Ausführungsformen der nachstehend beschriebenen Erfindung umfasst die Vorrichtung die Merkmale (a) Vorbereiten einer spektral abzubildenden Probe, (b) Betrachten der Probe durch eine optische Vorrichtung, wobei die optische Vorrichtung mit einem Abbildungsspektrometer optisch verbunden ist, wobei die

DE 296 24 210 U1

optische Vorrichtung und das Abbildungsspektrometer zum Erhalten eines Spektrums jedes Pixels der Probe dient, durch (i) Sammeln des einfallenden Lichts gleichzeitig von allen Pixeln der Probe unter Verwendung parallel ausrichtender optischer Bestandteile (ii) Durchgehen des einfallenden, parallel ausgerichteten Lichts durch ein, eine Anzahl von Elementen aufweisendes Interferometersystem, so dass das Licht zuerst in zwei kohärente Strahlen geteilt wird, die sich in unterschiedliche Richtungen innerhalb des Interferometers bewegen und sich dann wieder vereinigen, um miteinander zu interferieren, um einen austretenden Lichtstrahl zu bilden, (iii) Durchgehen des austretenden Lichtstrahls durch ein fokussierendes, optisches System, das den austretenden Lichtstrahl auf einen Detektor mit einer zweidimensionalen Anordnung von Detektorelementen fokussiert, so dass zu jedem Moment jedes der Detektorelemente die Abbildung eines und immer des gleichen Pixels der Probe während der ganzen Dauer der Erfassung ist, so dass die reale Abbildung der Probe stationär auf der Ebene der Detektoranordnung und zu jedem Zeitpunkt der Erfassung die Abbildung immer noch sichtbar und erkennbar ist und so dass jedes der Detektorelemente ein Signal erzeugt, das eine besondere Linearkombination der, durch die Pixel bei unterschiedlichen Wellenlängen emittierten Lichtintensität ist, wobei die Linearkombination eine Funktion der momentanen optischen Wegdifferenz ist, (iv) Drehen oder Verschieben eines oder mehrerer Elemente des Interferometersystems, so dass die optische Wegdifferenz zwischen den zwei, kohärenten, durch das Interferometersystem erzeugten Strahlen für alle Pixel der Probe gleichzeitig gescannt wird und (v) Aufnehmen der Signale jedes der Detektorelemente als Funktion der Zeit unter Verwendung einer Aufnahmevorrichtung, um einen ersten spektralen Datenwürfel zu bilden und (c) Auswerten des ersten, spektralen Datenwürfels unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Vorrichtung weiterhin den Schritt (d) Anzeigen der Zuordnung des ausgewerteten spektralen Datenkubuses.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die optische Vorrichtung ein Fluoreszenzmikroskop.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist das parallel ausgerichtete Licht ein von der Probe emittiertes Fluoreszenzlicht.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen stammt das Licht aus einer Quelle wie einem Laser, Weißlicht, gefiltertem Licht, ultravioletterem Licht oder einem Licht mit einem kleinem Wellenlängenbereich.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen stammt das Licht aus mehreren Lichtquellen, wobei die Quellen gleichzeitig oder nacheinander wirksam sind.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist

der zweidimensionale Träger ausgewählt aus der Gruppe bestehend, aus einer Videointervall-CCD, einer gekühlten CCD im hochdynamischen Bereich, einer verstärkten CCD und einer zeitgeschalteten verstärkten CCD.

5 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Probe eine Zelle während der Interphase, eine Zelle während der Mitose und/oder eine Zelle während der Meiose.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen stammt die Zelle von einem Menschen.

10 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Zelle eine kanzeröse Zelle, eine Blutzelle, eine fötale Zelle oder eine Zelle, die in Verdacht steht, bösartig zu sein.

15 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Probe eine Zelle, das Licht wird durch eine Sonde induziert, die Sonde bindet sich an einen spezifischen zellulären Bestandteil und die Vorrichtung dient zum Nachweisen der Gegenwart oder der Menge des zellulären Bestandteils.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Sonde eine konjugierte fluoreszierenden Komponente ein und die Induktion ist eine Fluoreszenzlichtemission der fluoreszierenden Komponente.

20 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Sonde ein Nukleinsäuremolekül ein, wobei die Vorrichtung zum Nachweisen der Gegenwart oder der Menge einer zellulären, mit dem Nukleinsäuremolekül hybridisierten Nukleinsäure dient.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Nukleinsäure Desoxyribonucleinsäure und/oder Ribonucleinsäure.

25 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die fluoreszierende Komponente SpectrumOrange™, SpectrumGreen™, Aqua, Texas-Rot, FITC, Rhodamin, Fluorescein, Kaskadenblau und/oder eine Kombination daraus.

30 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Punktoperationssanalyse des Spektrums von jedem Pixel der Probe.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Punktoperationsanalyse Zuordnen des Spektrums von jedem Pixel in der Probe in einen Skalar gemäß einer Transformationsfunktion ein.

35 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Punktoperationsanalyse Zuordnen des Spektrums von jedem Pixel in der Probe in ein anderes Spektrum gemäß einer Transformationsfunktion ein.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist

24 01 01

der mathematische Algorithmus eine morphologische Analyse.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Ähnlichkeits-zuordnende Analyse zum Berechnen einer spektralen Differenz aus einem Referenzspektrum für jeden Pixel in der Probe.

- 5 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen resultiert die Ähnlichkeits-zuordnende Analyse im Erzeugen einer Grauwert- oder einer Pseudofarben-Abbildung, in denen helle Pixel einer kleinen, spektralen Differenz und dunkle Pixel einer großen, spektralen Differenz entsprechen.

- 10 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen resultiert die Ähnlichkeits-zuordnende Analyse im Erzeugen einer Grauwert- oder einer Pseudofarben-Abbildung, in der helle Pixel einer großen, spektralen Differenz und dunkle Pixel einer kleineren, spektralen Differenz entsprechen.

- 15 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die spektrale Differenz ein Skalar, der als das Integral über einem bestimmten Wellenlängenbereich des absolut Wertes der Differenz zwischen dem Spektrum von jedem Pixel und des Referenzspektrums definiert ist.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Einteilung-Zuordnungsanalyse, die für das Spektrum jedes Pixels eine spektrale Differenz von verschiedenen Referenzspektren berechnet.

- 20 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen resultiert die Einteilung-Zuordnungsanalyse im Erzeugen einer vielfarbigten Abbildung, in der Pixelgruppen mit vorbestimmten, maximalen spektralen Differenzen von einem der mehreren Referenzspektren mit einer bestimmten künstlichen Farbe gefärbt sind.

- 25 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die spektrale Differenz ein Skalar, der als Integral über einem vorbestimmten Wellenlängenbereich des absoluten Werts einer Differenz zwischen dem Spektrum von jedem der Pixel und einem der mehreren Referenzspektren definiert ist.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Hauptkomponentenanalyse.

- 30 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Hauptkomponentenanalyse ein (a) Aufbauen einer kovarianten Matrix für alle Pixel und Wellenlängen der Erfassung, einschließlich Wellenlängen der anregenden Quellen, wenn mehrere Wellenlängen verwendet werden, (b) Diagonalisieren der kovarianten Matrix und Finden aller unabhängigen, orthogonalen Basiselemente, (c) Herausfinden, welche der Basis-
- 35 elemente gewisse Eigenschaften in der Probe markieren.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Linearkombinationsanalyse.

DE 296 24 210 01

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Linearkombinationsanalyse das Anlegen einer arithmetischen Funktion zwischen entsprechenden Wellenlängen entsprechender Pixelpaare ein, die zu dem ersten spektralen Datenwürfel und zu einem zweiten spektralen Datenwürfel gehören, um einen resultierenden dritten Datenwürfel zu erhalten.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Linearkombinationsanalyse einem Zweck wie dem Bilden eines Mittelwerts von zwei spektralen Datenwürfeln oder Nachverfolgen der zeitlichen Änderungen und spektraler Normierung.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Linearkombinationsanalyse Anlegen eines bestimmten Skalars an jede Wellenlänge der Spektren jedes Pixels durch eine arithmetische Funktion ein, wobei die Funktion eine Addition, Subtraktion, Multiplikation Division und/oder Kombinationen davon ist.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Linearkombinationsanalyse zur Hintergrundsubtraktion, bei der ein Spektrum eines in dem Hintergrundbereich der Probe angeordneten Pixels von den Spektren der Pixel der Probe subtrahiert wird.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Linearkombinationsanalyse dem Kalibrierungsverfahren, bei dem ein vor dem Betrachten der Probe erfasstes Spektrum zum Dividieren der Spektren der Pixel der Probe dient. Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Analyse der optischen Dichte.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Analyse der optischen Dichte zum Erhalten einer ausgewerteten Abbildung, die eine Zuordnung der optischen Dichte ist.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen berechnet der mathematische Algorithmus eine Rot-Grün-Blau- Farabbildung unter der Verwendung vorbestimmter Wellenlängenbereiche.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Rot-Grün-Blau-Farabbildung durch einen Kontrast-streckenden Algorithmus modifiziert. Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Rot-Grün-Blau-Farabbildung durch einen Kontrast-streckenden Algorithmus modifiziert.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen berechnet der mathematische Algorithmus ein Verhältnis zwischen Intensitäten bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen für jedes der Spektren der Pixel.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen berechnet der mathematische Algorithmus ein Verhältnis zwischen Intensitäten bei zwei

unterschiedlichen Wellenlängen für jedes der Spektren der Pixel und färbt jedes der Pixels in einer helleren oder dunkleren künstlichen Farbe gemäß des berechneten Verhältnisses.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Vorrichtung zur spektralen Identifizierung von mehrfachen, an der Sonde angebrachten, Fluorophoren.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten nachstehend beschriebenen Ausführungsformen ist die Vorrichtung eine fluoreszierende *in situ* Hybridisierungs-
vorrichtung, die die Merkmale umfaßt (a) Bereitstellen von Kernen eines Zelltyps mit
Chromosomen, wobei die Chromosomen mit wenigstens einer Nucleinsäuresonde hybridisiert
sind, jede der wenigstens einen Nucleinsäuresonde wenigstens ein Nucleinsäuremolekül
einschließt, wobei jedes des wenigstens ein Nucleinsäuremolekül mit wenigstens einem
Fluorophor markiert ist, (b) Betrachten des Zellkerns durch ein Fluoreszenzmikroskop, wobei
das Fluoreszenzmikroskop mit einem Abbildungsspektrometer optisch verbunden ist, wobei das
Fluoreszenzmikroskop und das Abbildungsspektrometer zum Erhalten eines Spektrums jedes
Pixels der Probe dient, durch (i) Sammeln des einfallenden Lichts gleichzeitig von allen Pixeln
des Zellkerns unter Verwendung parallel ausrichtender optischer Bestandteile (ii) Durchgehen
des einfallenden parallel ausgerichteten Lichts durch ein, eine Anzahl von Elementen
aufweisendes Interferometersystem, so dass das Licht zuerst in zwei kohärente Strahlen geteilt
wird, die sich in unterschiedliche Richtungen innerhalb des Interferometers bewegen und sich
dann wiedervereinigen, um miteinander zu interferieren, um einen austretenden Lichtstrahl zu
bilden, (iii) Durchgehen des austretenden Lichtstrahls durch ein fokussierendes, optisches System,
das den austretenden Lichtstrahl auf einen Detektor mit einer zweidimensionalen Anordnung von
Detektorelementen fokussiert, so dass zu jedem Moment jedes der Detektorelemente die
Abbildung eines und immer des gleichen Pixels des Zellkerns während der ganzen Dauer der
Erfassung ist, so dass die reale Abbildung des Zellkerns stationär auf der Ebene der
Detektoranordnung und dass zu jedem Zeitpunkt der Erfassung die Abbildung immer noch
sichtbar und erkennbar ist und so dass jedes der Detektorelemente ein Signal erzeugt, das eine
besondere Linearkombination der durch die Pixel bei unterschiedlichen Wellenlängen emittierten
Lichtintensität ist, wobei die Linearkombination eine Funktion der momentanen optischen Weg-
differenz ist, (iv) Drehen oder Verschieben eines oder mehrerer Elemente des Interferometer-
systems, so dass die optische Wegdifferenz zwischen den zwei, kohärenten, durch das Interfero-
metersystem erzeugten Strahlen für alle Pixel des Zellkerns gleichzeitig gescannt wird und (v)
Aufnehmen der Signale jedes der Detektorelemente als Funktion der Zeit unter der Verwendung
einer Aufnahmevorrichtung, um einen ersten spektralen Datenwürfel zu bilden und (c) Auswer-
ten des ersten, spektralen Datenwürfels unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist
das wenigstens eine Nucleinsäuremolekül wenigstens ein Locus, wenigstens ein fragmentiertes

Chromosom, wenigstens ein künstliches Hefechromosom einschließlich eines Inserts, wenigstens ein Plasmid einschließlich eines Inserts, wenigstens ein Cosmid einschließlich eines Inserts, wenigstens ein Phagemid einschließlich eines Inserts, wenigstens ein viraler Vektor einschließlich eines Inserts, ein vollständiges Genom einer Art, ein vollständiges Genom eines kanzerösen Gewebes und/oder Kombinationen davon.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist das vmindestens eine Fluorophor mindestens ein fluoreszierender, kombinatorischer Farbstoff.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der Zellkern ein Zellkern während der Interphase, ein Zellkern während der Mitose und/oder ein Zellkern während der Meiose.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die Anzahl der Nukleinsäureproben eins, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben acht, neun, zehn, elf, zwölf, dreizehn, vierzehn, fünfzehn, sechzehn, siebzehn, achtzehn, neunzehn, zwanzig, einundzwanzig, zweiundzwanzig, dreiundzwanzig, vierundzwanzig oder größer als vierundzwanzig, wobei jede der Sonden einen unterschiedlichen Fluorophor oder eine unterschiedliche Kombination der Fluorophore einschließt.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen sind die Chromosomen Interphase-Chromosome, Chromosome während der Mitose und Chromosome während der Meiose.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Punktoperationsanalyse des Spektrums von jedem der Pixel in dem Zellkern.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Punktdurchführungsanalyse Zuordnen des Spektrums vom jedem der Pixel in dem Zellkern in einen Skalar gemäß einer Transformationsfunktion ein.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Punktoperationsanalyse das Zuordnen des Spektrums von jedem der Pixel des Zellkerns in ein anders Spektrum gemäß der Transformationsfunktion ein.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine morphologische Analyse, wobei die morphologische Analyse die relative Größe der Chromosomen in den Zellkernen bestimmt.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Einteilung-Zuordnungsanalyse, die für das Spektrum von jedem der Pixel eine spektrale Differenz von wenigstens einem Referenzspektrum berechnet.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen resultiert die Einteilung-Zuordnungsanalyse im Erzeugen einer mehrfarbigen Abbildung, bei der Pixelgruppen mit vorbestimmten, maximalen spektralen Differenzen von einem der mehreren

Referenzspektren mit einer vorbestimmten, künstlichen Farbe angefärbt sind.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist die spektrale Differenz ein Skalar, der als Integral über einem vorbestimmten Wellenlängenbereich des absoluten Werts der Differenz zwischen dem Spektrum von jedem der Pixel und einem
5 der mehreren Referenzspektren definiert ist.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist der mathematische Algorithmus eine Hauptkomponentenanalyse.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Hauptkomponentenanalyse ein (a) Aufbauen einer kovarianten Matrix für alle Pixel
10 und Wellenlängen der Erfassung, einschließlich der Wellenlängen der anregenden Quellen, wenn mehrere Wellenlängen verwendet werden, (b) Diagonalisieren der kovarianten Matrix und Auffinden aller unabhängigen spektralen Basiselemente, (c) Herausfinden, welche der Basiselemente oder eine Kombination davon gewisse Eigenschaften in den Zellkernen markieren.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen ist
15 der mathematische Algorithmus eine Linearkombinationsanalyse.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Linearkombinationsanalyse zur spektralen Normierung.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen schließt die Linearkombinationsanalyse Anlegen eines bestimmten Skalars an jede Wellenlänge
20 der Spektren jedes Pixels durch eine arithmetische Funktion ein, wobei die Funktion Addition, Subtraktion, Multiplikation, Division und/oder Kombinationen davon ist.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Linearkombinationsanalyse zur Hintergrundsubtraktion, bei der ein Spektrum eines im
25 einem Hintergrundbereich der Zellkerne angeordneten Pixels von den Spektren der Pixel der Zellkerne subtrahiert wird.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Linearkombinationsanalyse einem Kalibrierungsverfahren, bei dem ein vor dem Betrachten der Zellkerne erfasstes Spektrum zum Dividieren der Spektren der Pixel der Zellkerne
dient.

30 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen berechnet der mathematische Algorithmus eine Rot-Grün-Blau- Farbabbildung unter Verwendung bestimmter Wellenlängenbereiche.

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen berechnet der mathematische Algorithmus ein Verhältnis zwischen Intensitäten bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen für jedes der Spektren der Pixel.
35

Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen berechnet der mathematische Algorithmus ein Verhältnis zwischen Intensitäten bei zwei unter-

schiedlichen Wellenlängen für jedes der Spektren der Pixel und färbt jedes Pixel gemäß des berechneten Verhältnisses in einer helleren oder dunkleren künstlichen Farbe.

5 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Vorrichtung für eine Anwendung, wie dem Bereitstellen eines Farb-Karyotyps embryonaler Zellen, Bereitstellen eines Farbkaryotyps von Leukozyten, Bereitstellen eines Farbkaryotyps von bösartigen Zellen und/oder Zellen, Bereitstellen eines Farbkaryotyps von auf Bösartigkeit untersuchten Zellen.

10 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen sind die embryonalen Zellen Chorionzotten-Zellen und/oder aus dem peripherischen Blut einer schwangeren Frau isolierte Zellen.

15 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient die Vorrichtung zum Nachweisen einer Trisomie des menschlichen Chromosom 21, einer menschlichen, chromosomalen Bande 21q22, eines Fragments menschlicher, chromosomaler Bande 21q22, des menschlichen Chromosoms 18, eines Fragments des menschlichen Chromosoms 18, des menschlichen Chromosoms 13 und eines Fragments des menschlichen Chromosoms 13.

20 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient das Bereitstellen des Farb-Karyotyps der auf Bösartigkeit untersuchten Zelle zum Erhalten einer farbigen Translokationszuordnung.

20 Gemäß noch weiterer Merkmale in den beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen dient das Bereitstellen des Farb-Karyotyps bösartiger Zellen zum Erhalten einer farbigen Translokationszuordnung.

25 Die vorliegende Erfindung überwindet erfolgreich die Nachteile der vorliegend bekannten Konfigurationen durch Bereitstellen einer Vorrichtung für *in situ* Hybridisierung, die empfindlich genug ist, um gleichzeitig Dutzende von spektral ähnlichen, aber dennoch ein wenig unterschiedlichen fluoreszierenden Sonden nachzuweisen, wobei die Vorrichtung damit zum Bereitstellen eines Farb-Karyotyps, in dem jedes Chromosomenpaar in einer unterschiedlichen RGB- oder künstlichen Farbe erscheint zum gleichzeitigen Locus-Zuordnen von Dutzenden von Loci, einer Kombination von Farb-Karyotyping und mehrfachem Loci-Zuordnen und sofort

30 erhältlicher, genetischer Inaugenscheinnahme für chromosomale Abweichungen fähig ist.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die hierin beschriebene Erfindung wird beispielhaft unter Bezug auf die anliegenden Zeichnungen beschrieben:

35 Figur 1 zeigt ein herkömmliches (Stand der Technik) Abbildungsspektrometer des Spalttyps.

Figur 2 ist ein Blockdiagramm, das die Hauptbestandteile eines Abbildungsspektrometers

24.01.01

zeigt, das in Übereinstimmung mit der US-P-08/392,019 (Stand der Technik) aufgebaut ist.

Figur 3 zeigt ein Interferometer des sich nicht bewegendes Typs, nämlich eines Sagnac-Interferometers, wie in einem Abbildungsspektrometer in Übereinstimmung mit der US-P-08/392,019 (Stand der Technik) verwendet.

5 Figur 4 zeigt eine Definition von Pseudo-RGB-(rot, grün, blau)-Farben zum Hervorheben ausgewählter Spektralbereiche. Die Intensität für jede Pseudo-Farbe wird durch Integrieren des Bereichs unter der Kurve berechnet, nachdem er mit einer der Kurven multipliziert wurde.

Die Figuren 5a, 5b und 5c zeigen Interphase-FISH, die mit zwei unterschiedlichen, an Texas-Rot und Rhodamin angebrachten Sonden durchgeführt wird, wobei (a) eine ursprüngliche
10 Abbildung ist, so wie sie durch ein Mikroskop aussieht, (b) die gleiche Probe nach dem Erfassen und Verarbeiten durch die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ist und (c) die Fluoreszenzspektren von dem Texas-Rot- und dem Rhodaminfluorophor sind.

Die Figuren 6a, 6b und 6c zeigen Interphase-FISH, die mit sechs unterschiedlichen Sonden durchgeführt wird, die jede mit einem unterschiedlichen Fluorophor markiert sind, wobei (a) eine
15 ursprüngliche Abbildung ist, so wie sie durch ein Mikroskop aussieht, wobei die Zellen mit DAPI gefärbt wurden, (b) die gleiche Probe nach dem Erfassen und Verarbeiten durch die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ist und (c) die Fluoreszenzspektren von den sechs Chromophoren sind.

Die Figuren 7a, 7b, 7c, 7d und 7e zeigen gemeinsam 24 normierte Spektren von 24 Pixeln
20 der Abbildung der Figuren 8a und 9a, wobei jedes der Pixel von einem unterschiedlichen, menschlichen Chromosom (1-22, X und Y) hergeleitet wird und wobei jedes Chromosom unter Verwendung eines unterschiedlichen Chromosomen-Färbers angefärbt wird, wie in den nachstehenden Tabellen detailliert ausgeführt wird.

Die Figuren 8a und 8b sind eine RGB-Abbildung und ein davon hergeleiteter Farb-
25 Karyotyp (dargestellt in Schwarz/Weiß), der vom ihr beziehungsweise von den 24 menschlichen, männlichen Chromosomen (1-22, X und Y) hergeleitet ist, wobei jedes Chromosom unter Verwendung eines unterschiedlichen Chromosomen-Anfärbungsmittels angefärbt ist, der unter Verwendung der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung erhalten wird, wie in den nachstehenden Tabellen detailliert ausgeführt wird.

30 Die Figuren 9a und 9b sind farbige Darstellungen der entsprechenden Figuren 8a und 8b.

Die Figuren 10a und 10b sind eine R-Bandenfärbungsphotographie für DAPI einer Chromosomenerweiterung einer weiblichen Brustkrebszelle ist, die mit einem herkömmlichen
Fluoreszenzmikroskop und einem RGB-Farb- Karyotyp unter Verwendung der Chromosomen-Anfärbungsmittel, wie in den Figuren 9a-b, und der entsprechenden Vorrichtung der
35 vorliegenden Erfindung (dargestellt in Schwarz /Weiß) erhalten wird.

Die Figuren 11a und 11b sind eine ursprüngliche und eine deutlichere Darstellung und eine Farbdarstellung der entsprechenden Figuren 10a und 10b.

DE 24 210 01

Figur 12 ist eine vergleichende Darstellung des R-Banden-gefärbten DAPI und einer interpretierten Außenlinie der angefärbten, verlagerten, in den entsprechenden Figuren 11a (links) und 11b (rechts) dargestellten Chromosomen, wie aus Figur 11b bestimmt und unter Verwendung des in Figur 9 gezeigten Farb-Karyotypen interpretiert.

5 Figur 13 ist eine Farbdarstellung von Figur 12.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

Die vorliegende Erfindung betrifft eine spektrale Abbildungsvorrichtung zum Nachweisen und Analysieren fluoreszierender *in situ* Hybridisierungen, bei denen zahlreiche Chromosomen-
10 Anfärbungsmittel und/oder Locus-spezifische Sonden eingesetzt werden, die alle mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination aus Fluorophoren markiert sind, wobei die Vorrichtung sowohl in räumlicher als auch in spektraler Auflösung hochempfindlich ist und zum gleichzeitigen Nachweisen von Dutzenden von Fluorophoren und/oder Kombinationen von Fluorophoren in der Lage ist, wobei die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung zum
15 Nachweisen von fluoreszierend angefärbten, vollständigen Chromosomensätzen und/oder mehreren Loci einer Art, wie dem Menschen, und zum Bereitstellen eines Farb-Karyotyps verwendet werden kann.

Zum besseren Verständnis der vorliegenden, wie in den Figuren 4-9 der Zeichnungen erläuterten Erfindung wird zuerst auf den Aufbau und die Betriebsweise eines herkömmlichen
20 (d.h. Stand der Technik) Abbildungsspektrometers des Spalttyps Bezug genommen, das eine zweidimensionale, wie in Figur 1 gezeigte Detektorenanordnung nutzt.

Damit umfasst das in Figur 1 erläuterte Abbildungsspektrometer des Spalttyps aus dem Stand der Technik ein wie bei 2 angezeigtes optisches Sammelsystem zum Sammeln des einfallenden Lichts einer Szene, das bei 4 schematisch angedeutet wird und das im Wesentlichen
25 paralleles Licht der Szene 4 auf eine erste in der Brennebene liegende Platte fokussiert, die von einem Spalt 6 in Anspruch genommen wird, um das Sichtfeld zu bestimmen. Das von Spalt 6 austretende Licht wird in einer Kollimatorlinse 8 parallel gerichtet und durch ein spektrales Streuelement 10 (beispielsweise ein Gitter) geschickt, um verschiedene Wellenlängen zu trennen. Der Output des spektralen Streuelements 10 wird durch eine fokussierende Linse 12 auf eine
30 zweidimensionale Detektoranordnung 14 in einer zweiten Brennebene fokussiert. Der Output der Detektoranordnung 14 wird einer Signalverarbeitungsvorrichtung 16 zugeführt.

In der zweidimensionalen Detektoranordnung 14, die den Stand der Technik des Abbildungsspektrometer der Figur 1 erläutert, bewirkt die Bewegung des Systems (beispielsweise eine Rasterbewegung oder ein durch Pfeil 13 angezeigtes Linienscanning) das Scanning entlang
35 einer Dimension. Das Scanning entlang der zweiten Dimension wird durch den Spalt 6 beeinflusst, der senkrecht zu der Bewegungsrichtung des Systems orientiert ist. Der Spalt 6 stellt damit sicher, dass jeder Detektor innerhalb der Anordnung 14 nur die Verteilung eines Pixels bei

einer einzelnen Wellenlänge zu jedem Zeitpunkt sieht. Dies ist notwendig, um die Spektren jedes Pixels zu trennen.

Wie im Abschnitt über den Stand der Technik vorstehend erläutert, besteht der Nachteil des in Figur 1 erläuterten Verfahrens gemäß dem Standes der Technik darin, daß die meisten
5 Pixel von einem Rahmen nicht zu jeden bestimmten Zeitpunkt gemessen werden, obwohl das optische System 2 eigentlich sogar Energie von allen von ihnen gleichzeitig sammelt. Als Ergebnis wird bei einem System, das einen derartigen Spalt nicht benötigt, die erforderliche Rahmenzeit deutlich erhöht und/oder das Signal/Rausch-Verhältnis (Empfindlichkeit) wesentlich erniedrigt.

10 Figur 2 ist ein Blockdiagramm, das die Hauptbestandteile eines verbesserten Abbildungsspektrometers gemäß dem Stand der Technik erläutert, das in der US-P-08/392,019, an Cabib *et al.*, eingereicht am 21. Februar, 1995, die unter bezugnahme aufgenommen wird, als wäre sie hier vollständig offenbart. Dieses Abbildungsspektrometer wurde sehr paasend dazu entworfen, die erfindungsgemäße Vorrichtung zu ergänzen.

15 Das Abbildungsspektrometer von Figur 2 gemäß dem Stand der Technik schließt damit ein: ein optisches Sammelsystem, das im Allgemeinen mit 20 bezeichnet wird, einen eindimensionalen Scanner, durch Block 22 angezeigt, eine Einrichtung zur Erzeugung optischer Weglängenunterschiede (optical path difference, OPD) oder Interferometer als Block 24
angezeigt, eine eindimensionale oder zweidimensionale Detektoranordnung, als Block 26
20 angezeigt, und eine Signalverarbeitungsvorrichtung und -anzeige, als Block 28 gekennzeichnet.

Ein problembehaftetes Element in System 20 ist die OPD-Erzeugungseinrichtung oder das Interferometer 24, die/das modulierte Licht ausgibt, das einem bestimmten Satz von Linearkombinationen der spektralen Intensität des emittierten Lichts entspricht, das von jedem Pixel der zu
analysieren Szene emittiert wird. Der Output des Interferometers ist auf eine Detektoranordnung
25 26 fokussiert. Damit werden alle erforderlichen, optischen Phasendifferenzen für alle Pixels des Sichtfeld gleichzeitig gescannt, um die vollständige Information zu erhalten, die erforderlich ist, um das Spektrum zu rekonstruieren. Die Spektren aller Pixel in der Szene werden damit gleichzeitig mit der Abbildungsinformation gesammelt und erlauben somit die Analyse der Abbildung in Echtzeit.

30 Das Gerät gemäß der US-P-08/392,019 kann bei einer großen Vielzahl von Konfigurationen angewendet werden. Besonders das verwendete Interferometer kann mit anderen Spiegeln kombiniert werden, wie in den relevanten Figuren der US-P-08/392,019 beschrieben wird.

Damit können gemäß der US-P-08/392,019 alternative Interferometertypen oder Interferometer eingesetzt werden. Diese schließen ein (1) einen bewegbaren Interferometertyp, in dem die
35 OPD variiert wird, um das Licht zu modulieren, nämlich ein Fabry-Perot-Interferometer mit gescannter Dicke, (2) einen Michelson-Interferometertyp, der einen Strahlteiler enthält, der den Strahl von einem optischen Sammelsystems erhält, sowie einen Scanner und den Strahl in zwei

Wege spaltet, (3) ein Sagnac-Interferometer, das optisch mit anderen optischen Mittel kombiniert ist, in denen die OPD mit dem Einfallswinkel der reinkommenden Strahlung variiert und (4) ein Interferometer mit vier Spiegeln plus Strahlteiler, wie in der zitierten US-Patentanmeldung weiter beschrieben wird.

5 Figur 3 erläutert ein Abbildungsspektrometer, das in Übereinstimmung mit der US-P-08/392,019 aufgebaut ist und bei dem ein Interferometer zum Einsatz kommt, bei dem die OPD mit dem Einfallswinkel der einfallenden Strahlung variiert. Ein Strahl, der in einem spitzen Winkel zur optischen Achse in das Interferometer eintritt, unterliegt einer OPD, die mit diesem Winkel im Wesentlichen linear variiert.

10 In dem Interferometer von Figur 3 wird die ganze Strahlung von Quelle 30 in allen Pixeln, nach dem sie parallel durch ein optisches System 31 gerichtet ist, durch einen mechanischen Scanner 32 gescannt. Das Licht wird dann durch einen Strahlteiler 33 zu einem ersten Reflektor 34 und dann zu einem zweiten Reflektor 35 geführt, der das Licht durch den Strahlteiler 33 zurück und dann durch eine fokussierende Linse 36 auf eine Detektoranordnung 37 (beispielsweise einen CCD) reflektiert. Dieser Strahl interferiert mit dem Strahl, der durch 33, dann durch den
15 zweiten Reflektor 35 und schließlich durch den ersten Reflektor 34 reflektiert wird.

Am Ende des Scans wurde jeder Pixel durch alle OPD's erfasst, wobei das Spektrum jedes Pixels der Szene durch Fourier-Transformation rekonstruiert werden kann. Ein zu der optischen Achse paralleler Strahl wird kompensiert und ein Strahl mit einem Winkel (θ) zu der optischen
20 Achse unterliegt einer OPD, die eine Funktion der Dicke des Strahlteilers 33, seinem Brechungsindex und dem Winkel θ ist. Der OPD ist proportional zu θ für spitze Winkel. Beim Anlegen der passenden Inversion und durch sorgfältiges Aufzeichnen wird das Spektrum jedes Pixels errechnet.

In der Konfiguration von Figur 3 geht der Strahl, der auf dem Strahlteiler bei einem Winkel
25 β ($\beta = 45^\circ$ in Figur 3) einfällt, durch das Interferometer mit einer OPD = 0, wohingegen ein Strahl, der bei einem allgemeinen Winkel $\beta - \theta$ einfällt, einer OPD unterliegt, die durch das folgende gegeben ist:

$$\text{OPD}(\beta, \theta, t, n) = t[(n^2 - \sin^2(\beta + \theta))^{0.5} - (n^2 - \sin^2(\beta - \theta))^{0.5} + 2\sin\beta\sin\theta] \quad (1)$$

30

wobei β der Einfallswinkel des Strahls auf dem Strahlteiler, θ die Winkeldistanz eines Strahls von der optischen Achse oder Interferometerdrehwinkel in Bezug auf die zentrale Stellung, t die Dicke des Strahlteilers und n der Brechungsindex des Strahlteilers ist.

Es folgt aus Gleichung 1, dass durch Scanning sowohl positive als auch negative Winkel in
35 Bezug auf die zentrale Stellung ein doppelseitiges Interferogramm für jedes Pixel erhalten werden können, das dazu beiträgt, Phasenfehler zu eliminieren, was genauere Ergebnisse in der Fourier-Transformationsberechnung ergibt. Die Amplitude beim Scannen bestimmt die maximal zu

erreichende OPD, die sich auf die spektrale Auflösung der Erfassung bezieht. Die Größe des Winkelschritts bestimmt den OPD-Schritt, der wiederum durch die kürzeste Wellenlänge vorgeschrieben wird, bei der das System empfindlich ist. Genau gesagt muß gemäß des Proben-
 5 theorems [siehe Chamberlain, The principles of interferometric spectroscopy, John Wiley and Sons (1979), 53-55] dieser OPD-Schritt kleiner sein als die Hälfte der Wellenlänge, bei der das System empfindlich ist.

Ein anderer Parameter, der berücksichtigt werden soll, ist die endliche Größe eines Detektorelements in der Matrix. Durch die fokussierenden optischen Bestandteile begrenzt das Element eine endliche OPD in dem Interferometer, was den Zusammenrolleffekt des Interferogramms mit
 10 einer rechteckigen Funktion aufweist. Dieses bewirkt als Konsequenz eine Verringerung der Systemempfindlichkeit bei kurzen Wellenlängen, die bis auf Null für Wellenlängen fällt, die gleich oder unter der durch das Element begrenzten OPD sind. Aus diesem Grund muß sichergestellt werden, dass die Bedingung für die Modulationstransferfunktion (MTF) erfüllt ist, d.h., dass die OPD, die durch ein Detektorelement in dem Interferometer begrenzt ist, kleiner sein
 15 muß als die kürzeste Wellenlänge, bei der das Instrument empfindlich ist.

Damit erfassen die in Übereinstimmung mit der Erfindung in der US-P-08/392019 offenbarten, aufgebauten Abbildungsspektrometer nicht nur die von jedem Pixel in dem Sichtfeld kommende Lichtintensität, sondern erfassen ebenfalls das Spektrum jedes Pixels in einem vorbestimmten Wellenlängenbereich. Sie nutzen ebenfalls die ganze Strahlung besser, die durch
 20 jedes Pixels in dem Sichtfeld zu einem bestimmten Zeitpunkt emittiert wird, und ermöglichen somit, wie vorstehend erklärt, eine deutliche Abnahme bei der Rahmenzeit und/oder eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit des Spektrometers. Derartige Abbildungsspektrometer können verschiedene Interferometertypen und optische Sammelsysteme und fokussierende Systeme einschliessen und können daher bei einer breiten Vielfalt von Anwendungen verwendet
 25 werden, einschließlich medizinischer Diagnostik und Therapie und biologischen Forschungsanwendungen, sowie Fernerkundung für geologische und landwirtschaftliche Untersuchungen und ähnliches.

Ein Abbildungsspektrometer in Übereinstimmung mit der in US-P-08/392,019 offenbarten Erfindung wurde durch Spectral Diagnostics (SD) Ltd., Industrial Park, Migdal Haemek, Israel
 30 entwickelt, das hier als SpectraCubeTM bezeichnet wird. Das mit einer Vielzahl von optischen Vorrichtungen verbundene SpectraCubeTM-System wurde verwendet, um die erfindungsgemäße Vorrichtung zu bilden. Das SpectraCubeTM-System weist folgende Eigenschaften auf, die hier nachstehend in Tabelle 1 aufgelistet sind.

35

Tabelle 1:

Parameter	Leistung
-----------	----------

Räumliche Auflösung:	30/M μm (M= wirksame Mikroskop- oder fore-optics-Vergrößerung (effective microscope or fore optics magnification))
Sichtfeld:	15/M Millimeter
Empfindlichkeit:	20 MilliLux (bei 100 msec Integrationszeit, nimmt bei längeren Integrationszeiten linear mit \sqrt{T} zu)
Spektralbereich:	400-1000 nm
Spektrale Auflösung:	4 nm bei 400 nm (16 nm bei 800 nm)
Erfassungszeit:	5-50 Sek, typisch 25 Sek
FFT Bearbeitungszeit:	20-180 Sek, typisch 60 Sek

Anzeige und Analyse von spektralen Abbildungen

a. Allgemeines

- 5 Wie vorstehend erwähnt ist die spektrale Abbildung eine dreidimensionale Datenanordnung $I(x, y, \lambda)$, die spektrale Information mit räumlicher Organisation der Abbildung kombiniert. Somit ist eine spektrale Abbildung aufgrund ihrer Anzahl an Dimensionen ein spektraler Würfel genannter Datensatz, der das Herausziehen von Eigenschaften und die Auswertung von Mengen ermöglicht, die andernfalls schwer, und in einigen Fällen unmöglich erhalten werden können. Da sowohl Spektroskopie als auch digitale Abbildungsanalyse gut bekannte Gebiete sind, die durch
- 10 eine große Menge an Literatur abgedeckt sind [siehe, beispielsweise, Jain, Fundamentals of Digital Processing, Prentice-Hall International (1989)] wird sich die nachstehende Diskussion hauptsächlich auf den Vorteil des Kombinieren spektroskopischer Information und Abbildungsinformation in einem einzigen Datensatz, d.h. einem spektralen Würfel fokussieren.
- 15 Ein möglicher Analysetyp eines spektralen Würfels ist, die spektralen und räumlichen Daten getrennt zu verwenden, d.h., spektrale Algorithmen an die spektralen Daten und zweidimensional abbildungsverarbeitende Algorithmen an die räumlichen Daten anzulegen.
- Als ein Beispiel eines spektralen Algorithmus wird ein Algorithmus in Betracht gezogen, der die Ähnlichkeit zwischen einem Referenzspektrum und den Spektren aller Pixel (d.h. Ähnlichkeits-Zuordnen) errechnet und einer Grauwert-(oder einer anderen Farbe)-Abbildung (d.h. einer Ähnlichkeitszuordnung) ergibt, bei der die Intensität bei jedem Pixel proportional zu dem Grad der "Ähnlichkeit" ist. Diese Grauwert-Abbildung kann dann durch die Verwendung von abbildungsverarbeitenden und maschinell sehenden Techniken (beispielsweise Abbildungsvergrößerungen, Mustererkennung etc.) weiter analysiert werden, um die gewünschten Eigenschaften und Parameter herauszuziehen. Mit anderen Worten Ähnlichkeits-Zuordnen umfasst das
- 20 Berechnen des Integrals des Absolutwertes der Differenz zwischen dem Spektrum jedes Pixels der spektralen Abbildung in Bezug auf ein Referenzspektrum (entweder vorher in einer Bibliothek gespeichert oder zu einem Pixel des gleichen oder anderen spektralen Abbildung
- 25

gehörend) und Anzeigen einer Grauwert- oder Pseudofarbabbildung (Schwarz/Weiß oder Farbe), bei der die hellen Pixel einer kleinen spektralen Differenz entsprechen und die dunklen Pixel einer großen spektralen Differenz entsprechen, oder umgekehrt.

Auf ähnliche Weise führt eine Einteilungs-Zuordnung die gleiche, wie für das Ähnlichkeits-
5 Zuordnung beschriebene Berechnung durch und nimmt bislang mehrere Spektren als Referenzspektren und färbt jeden Pixel der angezeigten Abbildung gemäß seiner Einteilung als das an ähnlichsten zu einem der mehreren Referenzspektren liegendem Pixel mit einer unterschiedlichen Pseudofarbe.

Es ist ebenfalls möglich, spektral Abbildungsalgorithmen anzulegen, die auf nicht trennbaren Rechengängen gestützt sind, d.h. Algorithmen, die sowohl lokale, spektrale Information als auch räumliche Wechselbeziehungen zwischen den angrenzenden Pixeln einschließen (einer dieser Algorithmen ist, wie nachstehend gesehen werden wird, eine Hauptkomponentenanalyse).

Eines der grundlegenden Erfordernisse, das natürlicherweise entsteht, wenn mit dreidimensionalen (3D) Datenstrukturen, wie einem spektralen Würfel (d.h. $I(x, y, z)$) gearbeitet
15 wird, ist das Visualisieren jener Datenstruktur auf sinnvolle Art und Weise. Anders als bei anderen Typen von 3D-Daten, wie tomographischen Daten $D(x, y, z)$, die beispielsweise durch ein konfokales Mikroskop erhalten werden, bei denen jeder Punkt im Allgemeinen die Intensität an einem unterschiedlichen Ort (x, y, z) in einem dreidimensionalen Raum darstellt, ist die spektrale Abbildung eine Sequenz von Abbildungen, die die Intensität der gleichen zwei-
20 dimensional Ebene (d.h. der Probe) bei unterschiedlichen Wellenlängen darstellen. Aus diesem Grund sind die zwei intuitivsten Arten, einen spektralen Datenwürfel zu betrachten, entweder die Abbildungsebene (räumliche Daten) oder die Intensität eines Pixels oder eines Satzes von Pixeln als eine Funktion von Wellenlänge in einer dreidimensionalen Berg und Tal Darstellung zu betrachten. Im Allgemeinen kann die Abbildungsebene zum Anzeigen von entweder der bei jeder
25 einzelnen Wellenlänge erfaßten Intensität oder der Grauwert-Abbildung verwendet werden, die nach dem Anlegen eines spektralen Analysealgorithmus über einem gewünschten spektralen Bereich bei jedem Abbildungspixel resultiert. Die spektrale Achse kann im Allgemeinen verwendet werden, um das resultierende Spektrum irgendeiner räumlichen Durchführung darzustellen, die in der Nähe jedes gewünschten Pixel durchgeführt wird (beispielsweise den Durchschnitt des
30 Spektrums ermitteln).

Es ist beispielsweise möglich, die spektrale Abbildung als eine Grauwert-Abbildung anzuzeigen, die ähnlich zu der Abbildung ist, die von einer einfachen monochromen Kamera oder einer Vielfarbenabbildung erhalten werden kann, die eine oder mehrere künstliche Farben nutzt, um wichtige Eigenschaften hervorzuheben und zuzuordnen. Da eine derartige Kamera einfach
35 das optische Signal über den spektralen Abstand (beispielsweise 400 nm bis 760 nm) der CCD-Anordnung integriert, kann die "equivalente" monochrome CCD-Kameraabbildung aus der spektralen 3D- Abbildungsdatenbank durch Integrieren entlang der spektralen Achse, wie

nachstehend, berechnet werden:

$$\text{gray_scale}(x, y) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} w(\lambda) \cdot I(x, y, \lambda) d\lambda \quad (2)$$

- In Gleichung 2 ist $w(\lambda)$ eine allgemein gewichtende Antwortfunktion, die beim Berechnen einer Vielzahl von Grauwert-Abbildungen die größte Flexibilität bereitstellt, die alle auf der Integration einer passenden gewichteten spektralen Abbildung über irgendeinen spektralen Abstand beruhen. Beispielsweise durch Berechnen der Gleichung (2) mit drei gewichtenden Funktionen $\{w_r(\lambda), w_g(\lambda), w_b(\lambda)\}$, die der Tristimulus-Antwortfunktionen für rot (r), grün (g) und blau (b) entsprechen, ist es möglich, eine entsprechende herkömmliche RGB-Farbabbildung anzuzeigen. Es ist zudem möglich, sinnvolle, nicht herkömmliche (Pseudo) Farbabbildungen anzuzeigen. Figur 4 zeigt ein Beispiel der Wirksamkeit dieses einfachen Algorithmuses. Unter der Annahme, dass $\{w_r, w_g, w_b\}$ derart ausgewählt sind, dass sie innerhalb eines Spektrums von Interesse verteilte Gauss-Funktionen bilden, wobei die resultierende Pseudo-Farbabbildung, die in diesem Fall angezeigt wird, nur Daten in den spektralen Bereichen, die den wichtenden Funktionen entsprechen, hervorhebt und den spektralen Differenzen in diesen drei Bereichen ermöglicht, deutlicher nachgewiesen zu werden.

b Punktoperationen

- Punktoperationen sind als die Operationen definiert, die an einzelnen Pixels durchgeführt werden (d.h. nicht mehr als einen Pixel zu einer Zeit einschließen). So kann beispielsweise bei einer Grauwert-Abbildung eine Punktoperation eine Operation darstellen, die die Intensität jedes Pixels (Intensitätsfunktion) einer anderen Intensität gemäß einer bestimmten Transformationsfunktion zuordnet. Ein besonderer Fall dieses Transformationstyps ist die Multiplikation der Intensität jedes Pixels mit einer Konstante.

- Das Konzept von Punktoperationen kann zudem auf spektrale Abbildungen ausgedehnt werden: hier weist jeder Pixel seine eigene Intensitätsfunktion (Spektrum) auf, d.h. einen n-dimensionalen Vektor $V_i(\lambda) : \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$. Eine auf eine spektrale Abbildung angelegte Punktoperation kann als eine Operation definiert werden, die dem Spektrum jedes Pixels einen Skalar (d.h. einen Intensitätswert) gemäß einer Transformationsfunktion zuordnet:

$$v_2 = g(V_1(\lambda)); \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (3)$$

- Bilden einer Grauwert-Abbildung gemäß Gleichung 3 ist ein Beispiel dieses Typs der Punktoperation. In einem allgemeineren Fall ordnet eine Punktoperation dem Spektrum (Vektor) jedes Pixels einen anderen Vektor gemäß einer Transformationsfunktion zu:

$$V_2(l) = g(V_1(\lambda)); l \in [l, N], \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n] \quad (4), \text{ wobei } N \leq n.$$

In diesem Fall wird eine spektrale Abbildung in eine andere spektrale Abbildung transformiert.

Nun kann die Definition von Punktoperationen ausgedehnt werden, um Operationen zwischen entsprechenden Pixeln unterschiedlicher spektraler Abbildungen einzuschließen. Ein wichtiges Beispiel dieses Algorithmustyps ist die optische Dichteanalyse. Optische Dichte wird eingesetzt, um Bereiche eines Objekts, das spektroskopisch mit höherem dynamischen Abstand als den Transmissionspektrum studiert wird, hervorzuheben und graphisch darzustellen. Die optische Dichte ist mit der Transmission durch eine logarithmische Operation verbunden und ist deshalb immer eine positive Funktion. Die Beziehung zwischen der optischen Dichte und den erfaßten Spektren ist durch das Lambert Beer'sche Gesetz bestimmt:

$$OD(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} = -\log_{10} \tau(\lambda) \quad (5)$$

wobei $OD(\lambda)$ die optische Dichte als eine Funktion der Wellenlänge, $I(\lambda)$ das erfasste Spektrum, $I_0(\lambda)$ ein erfaßtes Referenzspektrum und $\tau(\lambda)$ der spektrale Transmissionsfaktor der Probe ist. Gleichung 5 wird für jeden Pixel für jede Wellenlänge berechnet, wobei $I_0(\lambda)$ ausgesucht ist aus (1) einem Pixel in dem gleichen spektralen Würfel für den die OD berechnet ist, (2) einem entsprechenden Pixel in einem zweiten Würfel und (3) einem Spektrum aus der Bibliothek.

Es ist festzustellen, dass die optische Dichte weder von der spektralen Antwort des Erfassungssystems noch von der Uneinheitlichkeit des CCD-Detektors abhängt. Dieser Algorithmus ist nützlich, um die relative Konzentration und in manchen Fällen die absolute Absorptionsmittelkonzentration in einer Probe zuzuordnen, falls ihre Absorptionskoeffizienten und die Probenstärke bekannt sind. Daher sollte festgestellt werden, dass der Ausdruck "Niveau", wie er hier verwendet wird, sich ebenfalls auf die Ausdrücke "Menge", "relative Menge", "absolute Konzentration" und "relative Konzentration" bezieht.

Zusätzliche Beispiele schließen verschiedene Linearkombinationsanalysen ein, wie beispielsweise: (1) Anlegen eines bestimmten Spektrums an das Spektrum von jedem der Pixel in einer spektralen Abbildung durch eine arithmetische Funktion, wie Addition, Subtraktion, Multiplikation, Division und Kombinationen davon, um einen neuen spektralen Würfel zu erhalten, bei dem das resultierende Spektrum jedes Pixels die Summe, die Differenz, das Produktverhältnis oder die Kombination zwischen jedem Spektrum des ersten Würfels und dem ausgewählten Spektrum ist und (2) Anlegen eines bestimmten Skalars an die Spektren von jedem der Pixel der spektralen Abbildung durch eine wie vorstehend beschriebene, arithmetische Funktion.

Derartige Linearkombinationen können beispielsweise verwendet werden für Hintergrundsubtraktionen, bei der ein Spektrum eines sich im Hintergrundbereich befindenen Pixels von dem Spektrum von jedem der Pixel subtrahiert wird und für ein Kalibrierungsverfahren, bei dem ein vor der Probenanalyse erfaßtes Spektrum verwendet wird, um das Spektrum von jedem der

Pixels in der spektralen Abbildung zu dividieren.

- Ein anderes Beispiel schließt ein Abbildungsberechnungsverhältnis und Anzeigen einer Grauwert-Abbildung ein. Dieser Algorithmus berechnet das Verhältnis zwischen den Intensitäten bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen für jedes Pixel der spektralen Abbildung und färbt jedes der Pixel entsprechend mit einer helleren oder dunkleren künstlichen Farbe. Beispielsweise färbt es die Pixel für ein hohes Verhältnis hell und für ein niedriges Verhältnis dunkel (oder andersherum), um die Verteilung spektral empfindlicher Materialien anzuzeigen.

c. *Räumlich spektral kombinierte Operationen*

- In allen den vorstehend aufgeführten spektralen Abbildungsanalyzer Vorrichtungen werden die spektralen Daten mit Algorithmen verarbeitet. Die Wichtigkeit des Anzeigens der spektral verarbeiteten Daten als Abbildung ist meistens qualitativ und stellt dem Benutzer eine nützliche Abbildung bereit. Es ist jedoch ebenfalls abhängig von der Anwendung möglich, die vorhandenen Abbildungsdaten in noch sinnvolleren Weisen durch Anlegen von Algorithmen zu verwenden, die die räumlich-spektrale Korrelation nutzen, die bei einer spektralen Abbildung inhärent ist. Räumlich spektrale Operationen stellen die wirkungsvollsten Typen von spektralen Abbildungsanalysealgorithmen dar. Als Beispiel kann die nachstehende Situation in Betracht gezogen werden:

- Eine Probe enthält k Zelltypen, die mit k unterschiedlichen Fluorophoren gefärbt sind (der Ausdruck „Zelle“ wird hierbei sowohl für eine biologische Zelle als auch als „ein Bereich in dem Sichtfeld des Instruments“ verwendet). Jedes Fluorophor weist ein unterschiedliches Fluoreszenzemissionsspektrum auf und verbindet sich nur mit einem der k Zelltypen. Es ist wichtig, die durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Zelle für jeden einzelnen der k Zelltypen zu finden. Um diese Aufgabe zu bewältigen kann das folgende Verfahren verwendet werden: (1) Einteilen jedes Pixels in der Abbildung gemäß seines Spektrums zu einer von $k + 1$ Klassen (k -Zelltypen plus eine Hintergrund) gehörend, (2) Segmentieren der Abbildung in die verschiedenen Zelltypen und Bestimmen der Anzahl der Zellen von jedem Typ und (3) Summieren der durch jede Klasse beigetragene Fluoreszenzenergie und sie durch die Gesamtanzahl der Zellen von der entsprechenden Klasse dividieren.

- Dieses Verfahren macht sowohl von spektralen als auch von räumlichen Daten Gebrauch. Die relevanten, spektralen Daten nehmen die Form von kennzeichnenden Zellspektren an (d.h. spektraler „Signaturen“), während die räumlichen Daten aus Daten über verschiedene Zelltypen (d.h. Zellklumpen) bestehen, wovon einige dem Auge ähnlich erscheinen. Der ideale Erfassungstyp für diese Situation ist eine spektrale Abbildung. In der vorstehenden Situation können Zellen durch ihre kennzeichnende spektrale Signatur unterschieden werden. Somit wird eine geeignete Punktoperation eingesetzt, um eine synthetische Abbildung zu erzeugen, bei der jedem Pixel einer von $k + 1$ Werten zugewiesen wird. Unter der Voraussetzung, dass die Fluoreszenz-

emissionspektren der unterschiedlichen Zelltypen als $s_i(\lambda); i = 1, 2, \dots, k, \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$ bekannt sind und das erfaßte Spektrum bei jedem Pixel (x, y) $s_{x,y}(\lambda), \lambda \in [\lambda_1, \lambda_n]$ beträgt, dann ist der nachstehende Algorithmus ein mögliches Einteilungsverfahren (vorstehender Schritt 1):

- Man lasse e_i^2 die Ableitung des erfaßten Spektrums von einem bekannten Spektrum des am dem Zelltyp i angebrachten Fluorophors sein. Dann kann bei Anpassung einer „Distanz“-Definition mit der Methode der kleinsten Quadrate geschrieben werden:

$$e_i^2 = \sum_{\lambda \in R_\lambda} (s(\lambda) - s_i(\lambda))^2 \quad (6)$$

- wobei, R_λ der spektrale Bereich von Interesse ist. Jeder Punkt [Pixel (x, y)] in der Abbildung kann unter der Verwendung des nachstehenden Kriteriums in eine der $k + 1$ Klassen eingeteilt werden: Punkt $(x, y) \in$ Klasse $k + 1$, wenn $e_i^2 >$ Schwellenwert für alle $i \in [1, k]$,

wobei

(7)

Punkt $(x, y) \in$ Klasse p , wenn $e_i^2 <$ Schwellenwert und p derart ist, daß $\min[e_i^2] = e_p^2$

- Die vorstehenden Schritte 2 und 3 (Abbildungssegmentierung und Berechnung der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität) sind nun richtungsbetrieben und verwenden Operationen zum maschinellen Sehen auf der synthetischen Abbildung, die in Übereinstimmung mit dem in den Gleichungen 6 und 7 beschriebenen Algorithmus erzeugt wird.

- Ein anderer Ansatz ist das erfaßte Spektrum $s_{x,y}(\lambda)$ bei jedem Pixel als eine Linearkombination der k bekannten Fluoreszenzspektren $s_i(\lambda); i = 1, 2, \dots, k$ auszudrücken. In diesem Fall wird der Koeffizientenvektor $C = [c_1, c_2, \dots, c_k]$ gefunden, der löst

$$F = \min \sum_{\lambda \in R_\lambda} (s(\lambda) - \hat{s}(\lambda))^2 \quad (8)$$

$$\text{wobei } \hat{s}(\lambda) = \sum_{i=1}^k c_i \cdot s_i(\lambda)$$

Auflösen nach $\frac{dF}{dc_i} = 0$ für $i = 1, 2, \dots, k$ (d.h. finden der Werte von c_i , die F minimieren, ergibt

- die Matrixgleichung $C = A^{-1}B$ (9), wobei A eine Quadratmatrix von Dimension k mit den Elementen $a_{m,n} = [\sum_{\lambda \in R_\lambda} s_m(\lambda) \cdot s_n(\lambda)]$ (10) und B ein als $b_m = [\sum_{\lambda \in R_\lambda} s_m(\lambda) \cdot s(\lambda)]$, $m, n = 1, 2, \dots, k$ (11) definierter Vektor ist.

- Arithmetische Operationen können in ähnlicher Art und Weise an zwei oder mehrere spektrale Würfel und/oder Spektren mit bestimmten Pixeln oder Spektren von einer Bibliothek angelegt werden. Beispielsweise kann man das Anlegen einer arithmetischen Operation zwischen entsprechenden Wellenlängen von entsprechenden Paaren von Pixeln in Erwägung ziehen, die zu einem ersten und einem zweiten spektralen Datenwürfel gehören, um einem dritten spektralen Datenwürfel zum Zweck von beispielsweise, Durchschnittsbildung von zwei spektralen Daten-

würfeln, Nachverfolgen zeitlicher Änderungen, spektraler Normierung etc., zu erhalten.

- In einigen Fällen unterscheiden sich in einer spektralen Abbildung vorliegende Objekte (beispielsweise Zellen) zu einem gewissen Grad in den chemischen Bestandteilen und/oder der Struktur voneinander. Die Verwendung einer Hauptkomponentenanalyse durch Erzeugen von Kovarianz oder einer Korrelationsmatrix vergrößert diese kleinen Differenzen. Eine kurze Beschreibung der Hauptkomponentenanalyse, die eine Kovarianzmatrix verwendet, wird nachstehend gegeben. Für weitere, detaillierte Betrachtungen der Hauptkomponentenanalyse wird der Leser auf Martens and Naes, Multivariate Calibration John Wiley & Sons, Great Britain (1989) und auf Esbensen et al., Multi variance analysis - in practise, Computer-aided modeling as CAMO, and the Unscrambler's guide, Trondheim, Norway, Eds.(1994) verwiesen.

Damit werden die Pixelintensitäten der Abbildung bei der Wellenlänge λ_i ($i=1,...,N$) als ein Vektor betrachtet dessen Länge gleich der Anzahl der Pixel q beträgt. Da es N dieser Vektoren gibt, einen für jede Wellenlänge der Erfassung, können diese Vektoren in einer Matrix B' mit q Reihen und N Spalten angeordnet werden:

$$B' = \begin{matrix} & \text{Anzahl der Wellenlängen} \\ \text{Anzahl der Pixel} & \begin{matrix} B_{11} & \cdot & \cdot & B_{1N} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ B_{q1} & \cdot & \cdot & B_{qN} \end{matrix} \end{matrix} \quad (12)$$

Für jede der Spalten der Matrix B' ist ein Durchschnitt definiert:

$$M_i = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q B'_{ji}; i=1,...,N \quad (13)$$

und eine zweite normalisierte Matrix D wird definiert als:

24.01.01

$$B' = \begin{matrix} & \text{Anzahl der Wellenlängen} \\ & B_{11}/M_1 & \dots & B_{1N}/M_N \\ \text{Anzahl der Pixel} & \vdots & \ddots & \vdots \\ & B_{q1}/M_1 & \dots & B_{qN}/M_N \end{matrix} \quad (14)$$

5

Eine Kovarianzmatrix C ist für die Matrix B definiert: $C=B^T \cdot B$ mit den Abmessungen $N \times N$. C wird diagonalisiert und Eigenvektoren und Eigenwerte, verknüpft durch $C \cdot V_i = \mu_i V_i$, wobei V_i und N orthogonale Einheitsvektoren und μ_i die Eigenwerte sind, die die Varianz in Richtung des i -ten Einheitsvektor V_i darstellen. Im Allgemeinen stellen die niedrigsten Komponenten die höchste

10 Veränderlichkeit als eine Funktion der Pixel dar.

Die Produkte BV_i ($i=1, \dots, N$) sind die Projektionen der spektralen Abbildung auf die Elemente der orthogonalen Basis. Sie sind Vektoren mit q Elementen (q = Anzahl der Pixels) und können getrennt als Schwarz/Weiß-Abbildungen angezeigt werden. Diese Abbildungen können Eigenschaften aufdecken die für eine normale Schwarz/Weiß-Abbildung bei einer bestimmten

15 Wellenlänge oder einem bestimmten Wellenlängenbereich nicht offensichtlich sind.

Fluoreszenzspektroskopie

a. allgemeines

20 Die Verwendung mehrerer fluoreszierender Farbstoffe (d.h. Fluorophore) [siehe Jain, Fundamentals of Digital Image Processing, Prentice-Hall International, (1989)] ist eines der wirksamsten und allgemein gebräuchlichen Instrumente zum Analysieren von Geweben und Zellen. Die Fluoreszenz-Mikroskopie ist daher eines der wichtigsten, in der Lichtmikroskopie verwendeten experimentellen Verfahren [Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 25 Plenum Press, New York, London (1983)]. Die Wirkung der fluoreszierenden Sonden beruht hauptsächlich auf der großen Vielfalt an biologischen Strukturen, an die bestimmte Farbstoffe gebunden werden können [Waggoner, Applications of fluorescence in the biomedical sciences, Taylor et al. (Hrsgb.), New York: Alan Liss, Inc., (1986) 3-28]. Für eine ausführliche Zusammenfassung über fluoreszierende Sonden, siehe Mason (Hrsgb.) Fluorescent and 30 Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Techniques Series, herausgegeben von Sattelle, Academic Press Limited, London (1993), und Ploem und Tanke, Introduction to Fluorescence Microscopy, Oxford University Press, Royal Microscopical Society (1987).

Die rasche Entwicklung neuer und hochentwickelterer, mehrfarbig fluoreszierender Farbstoffmoleküle erzeugt weiterhin einen Bedarf nach fortgeschritteneren Fluoreszenz-Abbildungstechniken, die das ganze Potential dieser Farbstoffe nutzen können. Für eine Diskussion der 35 revolutionären Auswirkung, die fluoreszierende Farbstoffe hatten und weiterhin auf dem heute

DE 296 24 210 U1

eingeschlagenen Weg der Forschung haben werden, wird auf Taylor et al., The New Vision of Light Microscopy, American Scientist, Vol. 80 (1992) 322-335 verwiesen.

Die Einführung kombinatorischer Fluoreszenzfarbstoffe, bei denen verschiedene Kombinationen von ein paar wenigen Basis-Fluoreszenz-Farbstoffen verwendet werden, ist eine merkliche Verbesserung bei mehrfarbigen fluoreszierenden Farbstoffen, siehe Ried et al., Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging spectroscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1388-1392; und Ried, Fluoreszenz *in situ* Hybridsierung in der genetischen Diagnostik, Fakultät für Theoretische Medizin, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Jan. 1994).

Bio-Abbildungsvorrichtungen, bei denen die erfindungsgemäße Vorrichtung verwendet wird, stellen mehrere wichtige Vorteile für Fluoreszenzabbildungsanwendungen gegenüber auf Filtern basierenden Ansätzen bereit. Diese Vorteile schließen die nachstehenden ein: (1) Erfassung des vollständigen Spektrums, das viel bessere quantitative Einsicht in das eigentliche Verhalten von Farbstoffmolekülen in der betrachteten Probe bereitstellt, (2) Fähigkeit, einige der herkömmlichen von der unerwünschten Hintergrundlumineszenz ausgehenden Probleme zu überwinden, (3) unerwünschte oder unvorhersehbare spektrale Verschiebungen, die in dem Emissionsspektrum einer fluoreszierenden Sonde aufgrund ihrer Mikro-Umgebung (beispielsweise Temperatur) auftreten, können beim Bestimmen der Sondenkonzentration in Betracht gezogen werden, wobei derartige spektrale Verschiebungen nicht nur nachgewiesen, sondern ggf. erhebliche Fehler beim Analysieren der Sondenkonzentration verursachen würden, wenn die Fluoreszenzintensität nur mit einem Bandpass-Filter erfasst wird und (4) Vereinfachung von Fluoreszenzabbildungsbeschaffung, wie nachstehend in Detail gezeigt wird, falls sie in Verbindung mit geeigneten Analsealgorithmen verwendet wird ist es möglich, in einer einzigen Erfassung einige spektral überlappende Fluoreszenzfarbstoffe zu trennen und zuzuordnen. Tatsächlich ist es möglich, einige spektral verknüpfte Parameter durch das Anlegen fortgeschrittener Datenanalysealgorithmen, wie multivarianter Analyse, Hauptkomponentenregression und anderer Einteilungsalgorithmen gleichzeitig zu analysieren [siehe, Martens und Naes, Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Great Britain (1989)].

Erfindungsgemäßes, spektrales Bio-Abbilden stellt Mittel zum Beseitigen der mit der unerwünschten Hintergrundlumineszenz assoziierten Probleme wie folgt bereit. Fluoreszenzabbildungsmikroskopie wird gewöhnlich durch Verwendung eines Fluoreszenzfilterwürfels durchgeführt, der sicherstellt, dass die Probe durch die gewünschten kurzen Wellenlängen angeregt wird und dass nur jene Wellenlängen in einem begrenzten spektralen Band entsprechend der Fluoreszenzemission der Sonde den Detektor (beispielsweise Auge, Kamera, etc.) erreichen [Mason (Editor) Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, Biological Techniques Series, edited by Satelle, Academic Press Limited, London (1993)]. Da Fluoreszenzintensitäten gewöhnlich einige Größenordnungen unter der Intensität der

Anregungsquelle liegen, kann Hintergrundluminiszenz nie ganz beseitigt werden [Benson *et al.*, Cellbiol. 100 (1985) 1309-1323]. Die drei hauptsächlichen Quellen für unerwünschte Hintergrundluminiszenz sind: (1) Strahlung von der Anregungsquelle, die nicht vollständig durch den dichroitischen Spiegel und/oder die Filter abgeblockt wird, (2) Eigenfluoreszenz der Probe und
5 manchmal von den optischen Elementen und (3) Auswahl einer ungeeigneten (oder nicht optimalen) Kombination der Anregungsfilter, dichroitischen Spiegel und Sperrfilter. Diese Quellen können zur Hintergrundluminiszenz deutlich beitragen. Die Effekte der Eigenfluoreszenz der Probe kann gewöhnlich durch Auswählen fluoreszierender Sonden verringert werden, deren Absorptions- und Emissionsbanden nicht mit denen der zu erfassenden Probe überlappen. Durch
10 Auswählen der optischen Elemente, die passend bedeckt sind, um die Eigenfluoreszenz zu verringern, können auf ähnliche Weise die Effekte dieses Typs der Eigenfluoreszenz ebenfalls auf das Mindestmaß verringert werden.

Trotz der besten vorhandenen Filterverfahren macht es die unerwünschte Hintergrundluminiszenz häufig schwer und manchmal unmöglich, das relevante Fluoreszenzsignal von seinem
15 Hintergrund (Geräusch) abzuheben. Die erfindungsgemäße, spektrale Bio-Abbildungsvorrichtung ist andererseits dazu in der Lage, spektrale Differenzen zwischen (i) der spektralen Form und dem spektralen Bereich des Fluoreszenzfarbstoffes und (ii) der spektralen Form und dem spektralen Bereich der Hintergrundluminiszenz (einschließlich Eigenfluoreszenz) zu verwenden, um die Effekte der unerwünschten Hintergrundluminiszenz zu beseitigen.

Somit ist es durch Anlegen des passenden spektralen Abbildungsanalyseverfahrens an die Emissionsspektren von Fluoreszenzsonden möglich, das Signal/Rausch-Verhältnis und damit die Genauigkeit von Fluoreszenzabbildungserfassungen zu verbessern. Dieser Vorteil des spektralen Bio-Abbildungsansatzes ist von besonderer Wichtigkeit für eine Abbildung des Verhältnisses, wenn Mengenangaben des Ergebnisses gewünscht werden. Zusätzlich kann das spektrale Bio-
25 Abbildungssystem der vorliegenden Erfindung Zeit und Anstrengung sparen, die andernfalls mit dem Auswählen der optimalen Filter bei auf Filtern basierenden Erfassungen verbracht wird.

Die Beschaffung von mehrfarbigen Fluoreszenzabbildungen kann enorm vereinfacht werden, wenn die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen, spektralen Bio-Abbildungsvorrichtung mit geeigneten Fluoreszenzmarkierungen kombiniert wird. Um die durch das spektrale Bio-
30 Abbilden gebotenen Vorteile vollständig zu erfassen, wird der Leser aufgefordert, die gewöhnlichen Schritte in Erwägung zu ziehen, die bei der Verwendung eines auf Filter basierenden Abbildungsverfahrens eingeschlossen sind, um die Fluoreszenz von einer mehrere Sonden enthaltenden Probe zu erfassen. Zuerst müssen Sonden mit ausreichend unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren ausgewählt werden. Bei der heutigen
35 Praxis beschränkt diese Anforderung die Anzahl der fluoreszierenden Markierungen in einem Exemplar auf zwischen drei und fünf Sonden. Fluoreszenzabbildungen werden, eine Abbildung für jeden Farbstoff, dann erreicht, durch passendes Drehen der zwei Filterräder, wobei eines

- zum Auswählen der Anregungswellenlänge und ein anderes zum Erlangen des Emissionsspektrums dient oder alternativ zum Drehen eines Filtrerrades, das zum Auswählen einer Wellenlänge ausgerichtet ist, während das Emissionsspektrum durch einen dreifachen dichroistischen Filter erlangt wird. Ansätze, bei denen stimbare Filter (keine bewegbaren Teile) verwendet werden, um die Anregungs- und/oder Emissionswellenlänge zu steuern, wurden ebenfalls vorgeschlagen. Vor kurzem wurden ebenfalls mehrfach spektrale Interferenzfilter verwendet, um das Abbilden mehrfacher Fluorophore zu ermöglichen [Lengauer *et al.*, Human Molekular Genetics 2 (1993), 505-512]. Ein Mittel zum Ändern des dichroistischen Spiegels (beispielsweise durch Ändern der Filterwürfel) wird ebenfalls verlangt. Es ist zudem häufig notwendig, den Brennpunkt der Abbildung bei jeder Wellenlänge neu einzustellen und manchmal muß sogar die CCD-Kamerabelichtungszeit geändert werden, um höhere Signal/Rausch-Verhältnisse zu erreichen. Zusammengenommen erzeugen diese Einschränkungen ein Registrierungsproblem. Die resultierenden monochromen Abbildungen, wobei jedes einer Emission eines unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffes entspricht, werden dann pseudo-gefärbt und aufgeschichtet (unter der Verwendung eines digitalen Computers mit sofort erhältlicher Standard-Software). Die resultierende Abbildung zeigt die Anordnung von mehreren, fluoreszierenden, jeweils mit einer unterschiedlichen Pseudo-Farbe gefärbten Markierungen. Da leichte Änderungen der Lage des dichroistischen Spiegels bei den digitalisierten Abbildungen translationale Verschiebungen verursachen, ist es notwendig, dichroistische Spiegel mit Mehrfachwellenlängen zu verwenden [für die Verwendung eines dichroistischen Spiegels mit Durchlässigkeitseigenschaften für quadropole Wellenlängen, siehe Hiraoka *et al.*, Seminars in Cell Biology, Vol.2 (1992), 153-164] oder die Abbildungen vor ihrer Aufschichtung zu registrieren. Der Ansatz der Abbildungsregistrierung ist mehr gewöhnlich trotz der Tatsache, dass die Abbildungsregistrierung ein schweres Problem darstellt, da sie zeitaufwendig ist und häufig nur geringfügig zufriedenstellende Ergebnisse erzeugt. Dieses sind technische Herausforderungen, die ebenfalls berücksichtigt werden müssen, wenn mehrfarbige Fluoreszenzabbildungen erhalten werden sollen [Waggoner *et al.* Methods in Cell Biology (1989), Part B, Vol. 30, Kapitel 17, 449-478, editiert durch Taylor und Wang, Academic Press Inc.].
- Somit überwindet die Bio-Abbildungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung eine der grundlegenden Beschränkungen, die durch auf Filtern basierende Ansätze zur Fluoreszenzabbildung auferlegt sind. Durch Ermöglichen der gleichzeitigen Erfassung des Emissionsspektrums einer nicht begrenzten Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen (einschließlich Farbstoffen, deren Emissionsspektren zu einem großen Ausmaß überlappen, wie hier nachstehend in dem Beispielsabschnitt für die Texas-Rot- und Rhodaminfluorophore gezeigt wird), beseitigt das Bio-Abbilden das Erfordernis für das nachfolgende Erlangen der Abbildungen der Emissionen der mehrfach fluoreszierenden Sonden. Der Vorteil der Verwendung eines spektralen Bio-Abbil-

5 dungssystems ist am größten, wenn die verwendeten fluoreszierenden Sonden durch eine
gemeinsame Anregungsquelle angeregt werden können. In diesem Fall kann eine einzige
spektrale Abbildungsbeschaffung die Fluoreszenzemission von einer nahezu unbegrenzten
Anzahl von Farbstoffen einfangen und die Erfordernis, (1) nicht überlappende Farbstoffe auszu-
wählen, (2) Filterwürfel zu ändern, (3) Anregungs- und Emissionsfilter zu ändern, (4) den Brenn-
punkt und die Belichtungszeit zu optimieren oder (5) die Abbildungen zu registrieren wird besei-
tigt. Die Herausforderung ist natürlich, geeignete Farbstoffe auszuwählen, die mit einer gemein-
samen Quelle angeregt werden können. Farbstoffe, die durch Fluoreszenzenergie, die von/zu
einander transferiert wird, sind somit ideal geeignet für mehrfarbige Fluoreszenzabbildungen, bei
denen ein spektrales Bio-Abbildungssystem verwendet wird. Natürlich macht die Verwendung
von Farbstoffen mit ähnlichen Emissionvermögen den visuellen Nachweis (beispielsweise unter
dem Mikroskop) schwerer. Diese Begrenzung kann voraussichtlich durch Verwendung der
spektralen Bio-Abbildungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung gelöst werden.

15 **b. Spektrale Identifizierung multipler Fluorophore**

Die Verwendung der spektralen Bio-Abbildungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung ermög-
licht die gleichzeitige Erfassung mehrerer Farbstoffe (d.h. Fluorophore, fluoreszierender Kompo-
nenten) in einer Erfassung. Es gibt keine Beschränkung auf einen Farbstofftyp, selbst spektral
überlappende Farbstoffe (beispielsweise Rhodamin und Texas-Rot) können durch Anlegen ge-
eigneter Algorithmen (beispielsweise Linearkombination für Hintergrundsubtraktion, etc.) identi-
fiziert und ihr Vorkommen in einer Abbildung zugeordnet werden, wie nachstehend durch Bei-
spiele erläutert (siehe Beispiele 1 und 2). Falls jedoch mehrere Farbstoffe gleichzeitig verwendet
werden sollen, sollten ihre Anregungswellenlängen, Fluoreszenzintensitäten und Emissions-
spektren sorgfältig überlegt werden. Falls dies sorgfältig getan wird, können die Ergebnisse eben-
falls quantitativ analysiert werden. Beispielsweise kann die relative Konzentration mehrerer Pro-
teine bei einer einzigen Erfassung zugeordnet werden, die geeignete, fluoreszierend markierte,
spezifisch an diese Proteine bindenden Antikörper verwendet. Unter der Verwendung von stan-
dardmäßig kalibrierten Farbstoffen können ebenfalls die absoluten Konzentrationen bestimmt
werden.

30 Ein wichtiges Beispiel, bei dem der Nachweis mehrerer fluoreszierender Sonden einen
signifikanten Vorteil darstellen kann, ist FISH (fluoreszierende-in-situ-Hybridisierung)
[Emanuel, Growth Genetics and Hormones 9 (1993) 6-12], die zum Analysieren von Genen auf
Chromosomenebene und zum Auffinden möglicher derartiger genetischer Schädigungen, wie
Gen/Chromosomen Amplifikation, Deletion, Translokation, Umlagerung und anderer Anomalien
35 verwendet wird.

Bestimmte Krankheiten und Störungen, einschließlich vieler Krebsarten und angeborener
Schädigungen, sind genetische Störungen, die von Schädigungen an einem oder mehreren Genen

verursacht werden. Bei vielen anderen Erkrankungen ist bekannt oder wird angenommen, daß eine (mehrere) genetische Komponente(n) vorliegen, d.h., daß eine (mehrere) genetische Schädigung(en) existiert (existieren), welche die Erkrankung alleine nicht verursacht (verursachen), aber zu ihr beiträgt (beitragen) oder die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung der Erkrankung zu einem späteren Zeitpunkt im Leben erhöht (erhöhen), wobei die Phänomene in der Technik als multifaktorielle Erkrankungen und genetische Veranlagungen bekannt sind. Die Korrelation sichtbarer genetischer Schädigung mit bekannten Erkrankungen würde Ärzten das Stellen definitiver Diagnosen ermöglichen, und eine frühzeitige Erfassung und Behandlung vieler Erkrankungen gestatten. Genetische Beratungen können zukünftige Eltern und gefährdete Personen auf die Möglichkeit potentiell ernsthafter medizinischer Probleme in der Zukunft aufmerksam machen, wobei geeignete Intervention ermöglicht wird.

Mehr als 5000 genetische Störungen wurden nunmehr identifiziert, wobei viele mit mehrfachen genetischen Schädigungen assoziiert sind. Nach der Entdeckung, daß Chromosomen die Träger der Erbinformation sind, folgerten Wissenschaftler, daß es möglich sein sollte, sichtbare Schädigungen in Chromosomen zu dokumentieren, die für bestimmte Erkrankungen verantwortlich sind. In den 1960er Jahren wurden aus Mikroskopie basierende Anfärbe-Techniken zur Klassifizierung von Metaphase-Chromosomen-erweiterungen auf Objektträgern entwickelt. Während mehrerer Jahrzehnte wurde eine visuelle Analyse der Chromosomen-Bandenmuster zum Korrelieren menschlicher, genetischer Störungen mit beobachteten, strukturellen Anomalitäten in Metaphase-Chromosomen verwendet. Um kennzeichnende helle und dunkle Banden entlang ihrer Länge aufzuzeigen, werden Chromosomen gewöhnlich nach Giemsa-Anfärbung (G-Bandenfärbung) mit Hellfeld-Mikroskopie oder nach Fluoreszenz-Anfärbung (R-Bandenfärbung) mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Ein sorgfältiger Vergleich eines Bandenmusters von einem Patienten mit demjenigen normaler Chromosomen kann Anomalitäten, wie Translokationen (Austausch genetischen Materials zwischen oder innerhalb von Chromosomen), Deletionen (fehlende Chromosomen oder Fragmente von Chromosomen, Additionen, Inversionen und andere Mißbildungen, die Schädigungen und genetische Erkrankungen verursachen, aufzeigen.

Viele ernsthafte genetische Krankheiten, wie beispielsweise zystische Fibrose (cystic fibrosis, CF) und viele andere werden jedoch durch Mutationen verursacht, die Addition, Deletion oder Substitution nur eines Nucleotids oder einiger Nucleotide einschließen. Derart kleine Fehler sind durch vorstehend beschriebene, chromosomale Bandenfärbungstechniken nicht nachweisbar und für viele Jahre haben Zytogenetiker daran gearbeitet, Techniken zum Ermitteln der örtlichen Lage und zum Quantifizieren winziger Fehler zu entwickeln.

Die fluoreszierende *in situ* Hybridisierung (FISH) hat sich während der letzten 25 Jahre durch die Verbesserung einer Anzahl ergänzender Techniken entwickelt. Ihre Entstehung wurde vom Wunsch der Zellgenetiker bessere Werkzeuge zur Zuordnung des genauen Ortes der Gene

auf den Chromosomen zu entwickeln und sehr kleine, bei einer großflächigen Anfärbung der Chromosomen nicht sichtbare genetische Schädigungen nachzuweisen, angetrieben. Das Human Genom Projekt (HGP), eine breite Initiative zur Identifizieren und Zuordnen aller menschlichen Gene, zeigte Interesse an FISH und beschleunigte die Entwicklung der dringend erforderlichen Sonden. Gängige FISH-Techniken wurden ebenfalls durch die konkurrierende Entwicklung wirkungsvoller immunologischer Sonden, einer wachsenden Vielzahl an exzellenten Fluoreszenz-Farbstoffen für Mikroskopie und Spektroskopie und dramatische Verbesserungen an den, für Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Objektiven, Illuminatoren und Filtern möglich gemacht.

- Die Wirksamkeit und Nützlichkeit von FISH wird durch viele Faktoren bedingt: (1) FISH kann nicht nur bei isolierten Chromosomen und Kernen, sondern auch bei ganzen Zellen, in fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte verwendet werden, (2) sie weist vergleichsweise kleine Schädigungen nach (die Fähigkeit des Nachweisens kleinerer Schädigungen nimmt konstant zu), (3) sie stellt vergleichsweise schnell Ergebnisse zur Verfügung, (4) ihre moderaten Kosten erlauben die Verwendung in den meisten diagnostischen Laboratorien und Forschungslaboratorien, (5) Anpassung an verschiedene Sonden und Typen von Untersuchungsmaterial kann entwickelt werden, und (6) hohe Spezifität und Empfindlichkeit kann (7) innerhalb kurzer Zeit, gewöhnlich im Bereich von zwei Stunden, erreicht werden.

- Viele FISH Anwendungen erfordern von dem Zellgenetiker lediglich, durch das Okular eines Mikroskops oder auf die Abbildung am Monitor zu schauen und zu bestimmen, ob eine fluoreszierende Markierung vorliegt oder fehlt. Bei ein wenig komplexeren Untersuchungsmaterialien kann eine einfache Zählung von einer oder zwei farbigen Markierungen erfolgen. Die Fähigkeit zum Bearbeiten digitaler Abbildungen und aus ihnen numerische Daten zu herauszuziehen, fügt jedoch einen umfangreichen, neuen Satz von Möglichkeiten den FISH Techniken hinzu. Eine geeignete Abbildungsvorrichtung, wie die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kann sehr schwache FISH-Abbildungen verstärken, so daß die markierten Chromosomen und Loci klar identifizierbar sind. Unter einfach erreichbaren Versuchsbedingungen kann die Anzahl an markierten Stellen automatisch gezählt werden. Zusätzlich kann die Intensität an jeder markierten Stelle erfaßt und die Menge an DNA errechnet werden, um beispielsweise die von einem bestimmten Gen vorliegende Anzahl an Kopien aufzuzeigen. Hervorgehende Techniken, wie mehrfarbige FISH, setzten Farbabbildungsanalysen ein, um mehrere (3, 4, 5 und mehr) fluoreszierende Sonden nachzuweisen und zu quantifizieren.

- Wie vorstehend diskutiert, kann FISH Information über die Lokation der markierten Sonde, die Anzahl markierter Stellen auf jedem Chromosom und die Intensität der Markierung (die Menge an genetischem Material) an jeder Stelle zur Verfügung bereitstellen. Zentromerische (repetitive DNA) Sonden und Chromosomen-Anfärbungsmittel werden zum Markieren und Zählen der vorliegenden Anzahl an Kopien von jedem als Ziel gewählten Chromosom

DE 298 24 210 U1

verwendet. Locus-spezifische Sonden werden zum Zuordnen der Lokation kleiner Regionen genetischen Materials verwendet. Diese Sondentypen können bei intakten Interphase-Kernen, ebenso wie an Metaphase-Chromosomenveränderungen verwendet werden und können durch einen geeigneten Algorithmus visuell oder automatisch gezählt werden. Sie werden routinemäßig zum Identifizieren genetischer Erkrankungen verwendet, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie zu viele oder zu wenige Kopien eines bestimmten Chromosoms, Chromosomenfragments oder Gens aufweisen.

In sehr frühen Stadien einiger Krebsarten, lange bevor die Zellen als abnormal erkannt werden, kann ein zahlenmäßiges Anwachsen bestimmter Gene auftreten, ein im Fachgebiet als Gen-Amplifikation bekanntes Phänomen, die unter Verwendung Locus-spezifischer Sonden als nachweisbar sind. Bei Verwendung von FISH zum Nachweisen von Chromosomenanomalitäten in kanzerösen Zellen können Hinweise über das Entwicklungsstadium der Erkrankung erhalten werden und ermöglichen deshalb das Auswählen der geeignetste(n) Behandlung(en), wobei viele der Behandlungen stadienspezifisch wirksam sind. Durch Auswählen der für Stadien-spezifische Behandlung wird wertvolle Zeit gespart und das Leiden des Patienten auf ein Minimum reduziert.

Es ist möglich die gesamte Oberfläche eines bestimmten Chromosoms einheitlich bzw. gleichförmig zu markieren, indem das Chromosom isoliert wird (beispielsweise unter Verwendung von Durchflußzytometrie), auf physikalischem Wege (beispielsweise durch Ultraschallbehandlung) oder auf enzymatischem Wege (beispielsweise durch Endonukleasen), wobei es zerstückelt und ein Satz an Sonden gegenüber allen Fragmenten erzeugt wird. Vollständige Chromosomensonden, auch als Chromosomen-Anfärbungsmittel bekannt, markieren in fluoreszierender Weise alle Kopien ihres Zielchromosoms. Eine wichtige Anwendung der Chromosomen-Anfärbung ist der Nachweis von Deletionen und Translokationen zwischen zwei Chromosomen, die in kennzeichnender Weise in den früheren Stadien bestimmter Krebsarten auftreten.

Falls beispielsweise Chromosom A spezifisch mit einem grünen Anfärbungsmittel und Chromosom B spezifisch mit einem roten Anfärbungsmittel markiert wird, so wird eine Translokation genetischen Materials von A nach B als ein grüner Bereich, der neben einem roten Bereich angeordnet ist erscheinen (und umgekehrt). Gewöhnlich werden von normalen Chromosomen erzeugte Chromosomen-Anfärbungsmittel zum Nachweisen von Deletionen oder Translokationen an anormalen (Patienten) Chromosomen verwendet. Die umgekehrte Chromosomen-Anfärbung verwendet Sonden, die von einem abnormalen Chromosom erzeugt wurden, um DNA von verschiedenen normalen Chromosomen zu identifizieren, die Material zu dem anormalen Chromosom beitrugen. Die, wie nachstehend im Beispielsabschnitt als Beispiel ausgeführte, erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglicht die 24 unterschiedlichen, den menschlichen Karyotyp (d.h. Genom) umfassenden Chromosomen zu färben, jedes in einer

unterschiedlichen Farbe, und gleichzeitig einen menschlichen Farb-Karyotyp unter Verwendung eines einzelnen Hybridisierungsverfahrens, gefolgt von einer einzelnen kurzen Erfassung, nachzuweisen, zu identifizieren und sinnvoll anzuzeigen.

Vergleichende Genom-Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH), ist eine Variation der reversen Chromosomen-Anfärbung, bei der zwei Cocktails von DNA-Sonden aus ganzen Sätzen von Chromosomen erzeugt werden. Ein Cocktail wird aus einem Satz von normalen Chromosomen erzeugt und ein anderer aus einem Satz von anormalen (beispielsweise Tumor) Chromosomen. Die zwei Sätze werden unter Verwendung verschiedener Übermittlungsmoleküle erzeugt, so dass beispielsweise die normale DNA rote Fluoreszenz und die anormale DNA grüne Fluoreszenz zeigen wird. Eine normale Metaphaseerweiterung wird gleichzeitig mit beiden Cocktails hybridisiert und fortwährend unter Verwendung von Farbabbildungsanalyse ausgewertet. Bereiche normaler Chromosomen, die intensiver grün als rot fluoreszieren, zeigen an, dass DNA-Amplifikation (mehrfache Genkopien) bei dem Gen in den anormalen Zellen des Patienten stattgefunden hat. Bereiche mit mehr roter als grüner Fluoreszenz (verringertes Grün/Rot-Verhältnis) zeigen Stellen genetischer Deletionen in den Chromosomen des Patienten an und Bereiche mit gleicher grüner und roter Fluoreszenz zeigen an, dass an dieser Stelle keine DNA-Änderungen stattgefunden haben. CGH und verwandte Techniken sind komplexer als vorhergehende Markierungstechniken, wobei sie bislang das Können bieten, feinere und ausgedehntere genetische Veränderungen, als es früher möglich war, nachzuweisen und zu quantifizieren. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist für diese Typen der Analyse sehr geeignet.

Aus dem, was vorstehend gesagt wurde, folgt, dass Karyotypisierung, Translokation/Umlagerungs-Nachweis, Chromosomen-Deletion/Amplifikation und Gen-Kartierung aus der Verwendung der erfindungsgemäßen, empfindlichen, quantitativen, spektralen Abbildungsvorrichtung sehr großen Nutzen ziehen, die eine vollständige spektrale Abbildung bei relativ hoher spektraler Auflösung anstelle einer einfachen Farbfluoreszenzabbildung bildet. Dies erfolgt, da eine derartige Vorrichtung die Probenvorbereitungszeit verringert und dazu fähig wird, zwischen einer hybridisierten Fluoreszenzsonde und einer Sonde zu unterscheiden, die im Hintergrund (durch schmale spektrale Verschiebungen) verblieben ist, und eine bislang nicht erreichte große Anzahl an Sonden gleichzeitig zu erfassen.

Damit ist es eine der Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine FISH-Abbildungsvorrichtung bereitzustellen, die dazu bestimmt ist, die Vorteile der Sondentechnologie auszunützen. Erfindungsgemäß gibt es eine Möglichkeit zum enormen Erhöhen der Sondenanzahl, die bei einer gegebenen Chromosomenanalyse analysiert werden kann wie auch ein dramatisches Erhöhen der Geschwindigkeit und des Automatisierungsgrades, bei dem diese Information im Vergleich zu Verfahren des Standes der Technik erlangt werden kann.

Die FISH-Abbildungsanordnung der vorliegenden Erfindung nutzt die Vorteile des SpectraCubeTM-Systems aus, das zum gleichzeitigen Erlangen von Fluoreszenzspektren von allen Pixeln des mikroskopischen Sichtfelds und zum Nachweisen der Lokation von mehreren Fluoreszenzsonden bei einem einzigen Experiment befähigt ist. In Verbindung mit dem Vorhandensein von Chromosomen spezifischer Sonden und neuer Markierungsstrategien, wie in den nachstehenden Beispielen erläutert wird, ist die Vorrichtung zum Erzeugen eines FISH-Karyotypen fähig, wobei jedes Chromosom mit einer verschiedenen Farbe (d.h. 24 verschiedene Farben für einen menschlichen Karyotypen) angefärbt ist. Diese Vorrichtung resultiert in extrem hohen Probendurchsatz und erlaubt die Analyse einer im Wesentlichen unbegrenzten Sondenanzahl.

Wie vorstehend geschildert ist das Schlüsselkonzept der vorliegenden Erfindung die Verwendung mehrerer, fluoreszierender Sonden bei FISH-Assays. Zum Markieren von DNA-Sonden bei Fish-Assays sind zahlreiche Verfahren vorhanden, welche indirekte Verfahren einschließen, wobei unter Verwendung enzymatischer Reaktionen ein Hapten, wie Biotin oder Digoxigenin, in die DNA eingegliedert wird. Gemäß der Hybridisierung einer Metaphasen-Chromosomenvergrößerung oder von Interphase-Kernen wird eine fluoreszierende Markierung an dem Hybrid durch die Verwendung immunologischer Verfahren angebracht. Erst vor sehr kurzem wurden fluoreszierende Farbstoffe direkt in Sonden eingegliedert und ohne die Verwendung eines Zwischenschritts nachgewiesen. Standard-FISH-Farbstoffe schließen Fluorescein, Rhodamin, Texas-Rot und Kaskadenblau ein und Mehrfachsonden-FISH-Analyse kann durch das Markieren verschiedener Sonden mit verschiedenen Haptenen oder fluoreszierenden Farbstoffen und Kombinationen davon vervollständigt werden, die in der Technik als kombinatorische Sonden bekannt sind [siehe, Ried *et al.*, Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 1388-1392 und Ried, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in der genetischen Diagnostik, Fakultät für theoretische Medizin, Karl Ruprechts Universität Heidelberg (Jan. 1994)].

Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, die stattfindet, nachdem Lichtphotonen von einem Molekül absorbiert wurden, das als ein Fluorophor in dem elektronischen Grundzustand bekannt ist. Das Molekül wird als Ergebnis des Elektronentransfers auf ein höheres Energieniveau in einen angeregten Zustand angehoben. Diese überschüssige Energie wird abgestrahlt, wenn das Elektron in seinen ursprünglichen Grundzustand zurückkehrt, wobei ein Lichtquant freigesetzt wird. Die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts ist länger als die des absorbierten Lichts. Diese Verschiebung ist begrenzt und verursacht, dass die Emissions- und Anregungswellenlängen dicht beieinander liegen. Aus diesem Grund emittieren die Fluorophore, die in einem spektralen Bereich angeregt werden können, in einem ähnlichen spektralen Bereich. Wenn beispielsweise die Anregung im Blaubereich liegt, dann wird Emission im Grünbereich erwartet. Wenn daher

viele verschiedene Sonden verwendet werden sollen, die verschiedene Spektren emittieren, ist es einleuchtend, dass deren Wellenlängen dicht beieinander liegen müssen und ebenfalls häufig überlappen. Als Konsequenz ist es für die spektrale Auflösung von kritischer Wichtigkeit, zwischen den verschiedenen Sonden unterscheiden zu können.

- 5 Gemäß der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden einzelnen Sonden (eine Sonde, auf die in diesem Dokument Bezug genommen wird, bezieht sich ebenfalls auf eine kombinatorische Sonde) eine Pseudofarbe zugeteilt (d.h. durch einen RGB-Algorithmus) oder eine künstliche Farbe (d.h. eine vorbestimmte Farbe gemäß eines Einteilungsalgorithmus) und die Information wird auf einem Computerbildschirm angezeigt. Die Verwendung mehrfarbiger Fluoreszenz
- 10 eröffnet eine Möglichkeit zum Ausdehnen von FISH in wichtige klinische Anwendungen, die von den Mehrfachsonden Vorteile erlangen können. Beispiele schließen Aneuploidie- und strukturelle Chromosomenstudien, Nachweis von Markierungschromosomen und vollständige FISH-Karyotypen ein. Da Mehrfachinformation von einer einzigen Hybridisierung erhalten werden kann, wird der Durchsatz erhöht und interne Standards können verwendet werden, um
- 15 die Gendosierungseffekte zu prüfen oder das Deletionsausmaß zu bestimmen.

- Die erfindungsgemäße Vorrichtung nutzt den Nachweis von Fluoreszenz, die durch eine weiße oder kohärent, monochromatische Lichtquelle in wenigen, schmalen, spektralen Banden angeregt ist und einen Sensor mit gekühlter CCD. Damit können mehrere Spektren gleichzeitig erfasst werden, von denen jedes eine unterschiedliche Sonde darstellt. Dies wiederum erhöht die
- 20 Geschwindigkeit und Genauigkeit der Abbildungserfassung verglichen mit herkömmlichen Ansätzen, die mehrere Momentaufnahmen von Chromosomen aufnehmen und dann die Abbildung rekonstruieren, ein Verfahren, das zeitaufwendig ist und künstliche Ergebnisse erzeugt, wie alles vorstehend beschrieben wird. Somit stellt die vorliegende Erfindung ein hoch signifikantes Verfahren gegenüber der zytogenetischen Abbildung gemäß dem Stand der Technik
- 25 dar, weil es einen empfindlicheren, schnelleren und genaueren Nachweis von Mehrfachsonden erlaubt.

- Damit wird erfindungsgemäß eine fluoreszierende *in situ* Hybridisierungsvorrichtung bereitgestellt, wobei die Vorrichtung die Merkmale einschließt von (a) Bereitstellen von Kernen eines Zelltyps mit Chromosomen, wobei die Chromosomen mit wenigstens einer
- 30 Nucleinsäuresonde hybridisiert sind, jede der wenigstens einen Nucleinsäuresonde wenigstens ein Nucleinsäuremolekül einschließt, wobei jedes des mindestens einem Nucleinsäuremolekül mit mindestens einem Fluorophor markiert ist, (b) Betrachten des Zellkerns durch ein Fluoreszenzmikroskop, wobei das Fluoreszenzmikroskop mit einem Abbildungsspektrometer optisch verbunden ist, wobei das Fluoreszenzmikroskop und das Abbildungsspektrometer zum
- 35 Erhalten eines Spektrums jedes Pixels der Probe dient, durch (i) Sammeln des einfallenden Lichts gleichzeitig von allen Pixeln des Zellkerns unter Verwendung parallel ausrichtender optischer Bestandteile, (ii) Durchgehen des einfallenden, parallel ausgerichteten Lichts durch ein,

eine Anzahl von Elementen aufweisendes Interferometersystem, so dass das Licht zuerst in zwei kohärente Strahlen geteilt wird, die sich in unterschiedliche Richtungen innerhalb des Interferometers bewegen und sich dann wiedervereinigen, um miteinander zu interferieren, um einen austretenden Lichtstrahl zu bilden, (iii) Durchgehen des austretenden Lichtstrahls durch ein
 5 fokussierendes, optisches System, das den austretenden Lichtstrahl auf einen Detektor mit einer zweidimensionalen Anordnung von Detektorelementen fokussiert, so dass zu jedem Moment jedes der Detektorelemente die Abbildung eines und immer des gleichen Pixels des Zellkerns während der ganzen Dauer der Erfassung ist, so dass die reale Abbildung des Zellkerns stationär auf der Ebene der Detektoranordnung und dass zu jedem Zeitpunkt der Erfassung die Abbildung
 10 immer noch sichtbar und erkennbar ist und so dass jedes der Detektorelemente ein Signal erzeugt, das eine besondere Linearkombination der durch die Pixel bei unterschiedlichen Wellenlängen emittierten Lichtintensität ist, wobei die Linearkombination eine Funktion der momentanen optischen Wegdifferenz ist, (iv) Drehen oder Verschieben (d.h. Scannen) eines oder mehrerer Elemente des Interferometersystems, so dass die optische Wegdifferenz zwischen den
 15 zwei, kohärenten, durch das Interferometersystem erzeugten Strahlen für alle Pixel des Zellkerns gleichzeitig gescannt wird und (v) Aufnehmen der Signale jedes der Detektorelemente als Funktion der Zeit unter der Verwendung einer Aufnahmevorrichtung, um einen ersten spektralen Datenwürfel zu bilden und (c) Auswerten des ersten, spektralen Datenwürfels unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus.

20 Die Nucleinsäuresonden können Loci, fragmentierte Chromosomen, künstliche Hefechromosomen einschließen, wobei alle einen Einschluß, Plasmide, Kosmide, Phagemide oder virale Vektoren einschließen, wobei alle einen Einschluß, vollständige (d.h. ganze) Genome einer Art oder ein kaneröses Gewebe und Kombinationen davon einschließen. Die Fluorophore können ein einzelner fluoreszierender Farbstoff oder ein kombinierter, fluoreszierender Farbstoff sein,
 25 der eine unterschiedliche Kombination einzelner fluoreszierender Farbstoffen ist. Der Zellkern kann ein Kern während der Interphase, ein Kern während der Mitose und ein Kern während der Meiose sein und folglich können die Chromosomen Interphasen-Chromosomen, Chromosome während der Mitose oder während der Meiose sein. Die Anzahl der Nucleinsäuresonden kann eins, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn, elf, zwölf, dreizehn, vierzehn,
 30 fünfzehn, sechzehn, siebzehn, achtzehn, neunzehn, zwanzig, einundzwanzig, zweiundzwanzig, dreiundzwanzig, vierundzwanzig oder größer als vierundzwanzig sein, wobei jede der Sonden ein unterschiedliches Fluorophor oder eine unterschiedliche Kombination an Fluorophoren (d.h. eine kombinatorische Sonde) einschließt. Der mathematische Algorithmus kann sein: (a) eine Rot-Grün-Blau-Farbabbildungsberechnung, die vorbestimmte Wellenlängenbereiche verwendet, (b) eine Einteilungs-Zuordnungs-Analyse, die für das Spektrum von jedem der Pixel
 35 eine spektrale Differenz von wenigstens einem Referenzspektrum berechnet, (c) eine Linearkombinationsanalyse, wobei die Analyse zur Hintergrundsubtraktion kombiniert mit Ein-

teilungs-Zuordnungs-Analyse dient, (d) eine Hauptkomponentenanalyse und (e) jeder andere Algorithmus, der für die Einteilung der Pixel gemäß ihrer assoziierten Spektren geeignet ist.

Nun wird auf die folgenden Beispiele Bezug genommen, die zusammen mit der vorstehenden Beschreibung die Erfindung erläutern.

5

Beispiel 1:

Verbesserte fluoreszierende *in situ* Hybridisierung (FISH) unter Verwendung von SpectraCubeTM, eines Linearkombinalgorithmuses und eines Einteilungs-Zuordnungsalgorithmuses

10 Spektrale Bio-Abbildung, die das SpectraCubeTM-System kombiniert mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet, vergrößert die Brauchbarkeit von FISH dadurch, dass der gleichzeitige Nachweis einer großen Anzahl von Sonden in einer einzigen Erfassung mit hoher Genauigkeit ermöglicht wird. Als Konsequenz werden die Wirksamkeit und die Verlässlichkeit des Nachweises von genetischen Anormalitäten durch FISH außerordentlich erhöht.

15 Wie vorstehend detailliert beschrieben spielt fluoreszierende *in situ* Hybridisierung (FISH) eine zunehmend wichtige Rolle in manchen Forschungs- und Diagnosebereichen. Seit ihrer ersten Einführung in den 70ern hat die FISH-Technik deutliche Fortschritte gemacht, wobei sie den Nachweis und die Identifizierung einzelner Gensequenzen, Chromosomensequenzbereiche und sogar ganzer Chromosome (d.h. Chromosomenanfärbung) ermöglicht. Die vielen Anwendungen von FISH erstrecken sich von der Früherkennung zu pränataler Diagnose, Aneusomie und andern, um genetische Krankheiten und Anormalitäten zu entdecken und danach zu behandeln.

20 Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität von FISH, die auf Hybridisierung homologer Nucleinsäuresequenzen basiert, können sogar so kurze wie 1 Kilobasen (kb) – Sequenzen erfaßt werden (und dies wird sich wahrscheinlich mit der Zeit verbessern, um der Nachweis von derart kurzen Sequenzen wie 15- 30 Basenpaaren zu ermöglichen und als 25 Konsequenz von Punktmutationen). FISH kann sowohl bei Interphasen- als auch bei Metaphasenzellen und sogar bei ganzen Geweben angewendet werden, wobei ein breiter Bereich von Anwendungen sowohl in dem Gebiet der Zytogenetik als auch in der Pathologie ermöglicht wird. FISH verbessert sich gemeinsam mit den Verbesserungen von DNA-Sonden, fluoreszierenden Farbstoffen (besonders durch die Einführung kombinatorischer Sonden), Fluoreszenzmikroskopie, Hochleistungs-CCD-Kameras und Abbildungstechniken.

30 Die Fähigkeit, mehrere Sonden gleichzeitig nachzuweisen, wurde schon in der Literatur gezeigt, um FISH zu einem effizienten diagnostischen Werkzeug zu machen [Rudkin und Stollar, Nature 55 (1977), 172-173]. Die bestehenden Verfahren sind jedoch hinderlich und schwer zu verwenden. Wie hier nachstehend in Beispielen erläutert wird, wird der Nachweis von vielen Sonden durch das SpectraCubeTM-System in Kombination mit passenden Algorithmen aufgrund seiner spektralen Auflösung und Empfindlichkeit außerordentlich verbessert. Um diese

Fähigkeit zu veranschaulichen, wird der Leser auf die Figuren 5a-c verwiesen, die ein Beispiel einer Interphasen-FISH-Erfassung einschließen, die mit Chromosom 1 und Chromosom 17 spezifischen DNA-Sonden durchgeführt wird, die mit den entsprechenden Fluorophoren Texas-Rot und Rhodamin markiert sind, deren Fluoreszenzspektren sich sehr ähneln. Die Chromosom-1-Sonde war eine Mittelsatellit-Sonde für den subtelomerischen Bereich des Chromosoms und war mit Texas-Rot markiert, das mit der DNA-Sonde über Posthybridisierung mit Biotin verbunden ist. Die Chromosom-17-Sonde war eine α -Satellit-Sonde für den zentromerischen Chromosomenbereich und war mit Rhodamin markiert, das über Posthybridisierung mit Digoxigenin mit einer zweiten DNA-Sonde verbunden ist. Figur 5a zeigt die ursprüngliche Abbildung, wie sie durch das Mikroskop für das Auge aussieht, Figur 5b zeigt die gleiche Probe, nach dem sie durch das SpectraCube™-System erfasst und verarbeitet wurde und Figur 5c zeigt die Fluoreszenzspektren des Texas-Rot-Fluorophors (mit T gekennzeichnet) und des Rhodaminfluorophors (mit R gekennzeichnet).

Wie in Figur 5c ersichtlich unterscheiden sich die Peaks von Texas-Rot und Rhodamin nur um 15 nm und deshalb wäre es sehr schwierig, zwischen ihnen bei der Verwendung eines auf Filtern basierenden System zu unterscheiden.

Durch ein Mikroskop, wie in Figur 5a gezeigt, auf eine Farb-FISH-Abbildung schauend, ist das Konfidenzniveau zum Erkennen der genauen Anzahl an Punkten (gekennzeichnet 1-4) und der in der Abbildung erscheinenden Sondentypen nicht besonders hoch. Wie in Figur 5b gezeigt, ist andererseits das SpectraCube™-System, das den Vorteil des für jeden Pixel erfaßten Spektrums nutzt, dazu in der Lage, aufgrund der kleinen spektralen Differenz zwischen ihnen sowohl das Vorhandensein der Punkte zu bestätigen, sie exakt zu zählen als auch zwischen Paaren mit einem hohen Konfidenzniveau zu unterscheiden. Durch wie in Figur 5c gezeigtes, künstliches Färben mit Texas-Rot- und Rhodaminfluoreszenz kann die Lokation der Sonden spezifischen Fluoreszenz mit hoher Genauigkeit bestimmt werden, wobei die Punkte 1 und 2 von Texas-Rot und die Punkte 3 und 4 von Rhodamin stammen.

Die Figuren 6a-b sind ein Beispiel einer FISH-Erfassung nach Hybridisierung einer Kern-DNA in der Interphase mit sechs verschiedenen Sonden. Figur 6a zeigt die ursprüngliche Abbildung. Figur 6b zeigt die SpectraCube™-Erfassung, spektrale Verarbeitung und künstliches Farbdarstellen von allen der nachgewiesenen Paare und Figur 6c zeigt die Spektren der sechs Chromophore nach der Hybridisierung (gemäß den Chromosomen gekennzeichnet, wobei jedes davon die Markierung trägt: 1, 8, 10, 11, 17 und X), wie sie durch einen dreifachen dichroitischen Filter unter Verwendung des SpectraCube™-Systems nachgewiesen werden. (Für Details bezüglich der Fluorophoren, Sonden und Chromosomen wird der Leser auf die folgende Beschreibung, die nachstehende Tabelle 2 und auf Chroma Corp. Cat. No. 61502 verwiesen).

Es ist aus Figur 6a, die die ursprüngliche RGB-Abbildung des Interphasen-Zellkerns zeigt, ersichtlich, dass es schwer ist, die Farben untereinander durch das Auge oder sogar durch die

Verwendung einer einfachen RGB-Farberfassung zu unterscheiden. Ein erfahrener Betrachter kann im besten Fall drei der sechs Farben erfassen. Figur 6b zeigt jedoch die gleiche wie in Figur 6a gezeigte Probe nach der Verarbeitung der spektralen Daten mit Eigen-Einteilungsalgorithmen für Hintergrundsubtraktion und Einteilung (siehe vorstehende Details) und die resultierenden Punkte wurden mit künstlichen Farben wie folgt hervorgehoben : braun-B1, cyan-C, blau-B2, gelb (yellow)-Y, grün-G und rot-R, während dem Hintergrund eine künstliche Farbe schwarz (black)-B3 zugeordnet wurde. Wie beobachtet, ist es möglich, alle sechs Fluorophorenpaare zu sehen und die Paare leicht zu unterscheiden.

Es wird weiter festgestellt, dass ein Paar, das in blau (B2) hervorgehoben ist, kaum vom Auge oder durch die Verwendung einer Farbkamera erkannt werden kann. Es wird jedoch nach Anlegen eines Hintergrundsubtraktionsalgorithmus an den spektralen Würfel nachgewiesen (vergleiche Figur 6a mit 6b).

Die verwendeten Sonden waren fünf α -Satellit-Sonden für die zentromeren Chromosomenbereiche 8, 10, 11, 17 und X und eine Mittelsatellit-Sonde für den subtelomeren Chromosomenbereich 1. Die Fluorophore, die verwendet werden, um jedes der vorstehenden Chromosomen zu markieren, und den DAPI-Kontrastfärber (Hintergrund), ihre Emissionspeaks und künstliche angezeigten Farbeinteilungen, werden in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Von den normierten, spektralen Signaturen von jedem der sechs in Figur 6c gezeigten Fluorophore ist es klar, dass ein auf Filtern basierendes System, das bei wenigen, relativ weiten Spektralbereichen erfaßt, nicht in der Lage ist, wegen der großen Überlappung der Spektren zuverlässig zwischen den verschiedenen Sondenarten zu unterscheiden. Ein derartiges System ist von einer absoluten Intensitätserfassung jeder Sonde abhängig und wird deshalb durch Hintergrundsignale und Rauschen mehr betroffen. Es sollte weiter festgestellt werden, dass spektrales Überlappen manchmal ebenfalls mit von der Zelle selbst stammenden Autofluoreszenz auftritt. Auch in diesem Fall ermöglicht die Zugänglichkeit der spektralen Information für jedes Pixel das Beseitigen des Autofluoreszenzbeitrages und bringt genauere Ergebnisse.

Tabelle 2:

Chromosom	Fluorophor	Emissionspeak	angezeigte Farbe
8	SpektrumOrange ^{TM1}	588nm	braun (B1)
10	SpektrumGreen ^{TM1}	538nm	cyan (C)
X	Aqua ¹	480nm	blau (B2)
1	Texas-Rot ²	615nm	gelb (yellow, Y)
17	FITC ³	525nm	grün (G)
11	Texas-Rot ² +FITC ³	615, 525nm	rot (R1)
Hintergrund	DAPI ⁴		schwarz (Black, B3)

¹ erhalten als markierte Deoxynucleotide von Vysis, Downers Grove, IL, U.S.,

² verbunden über Anti-Digoxigeninantikörper an vorhybridisiertes, Sonden enthaltendes Digoxigenin,

³ Fluorescein-5-isothiocyanat, verbunden über Anti-Biotinantikörper an vorhybridisiertes, Sonden enthaltendes Biotin,

⁴ 4',6- Diamino-2-phenylindol, das zur Kontrastfärbung verwendet wird.

5 Das gesamte Spektrum jedes Punkts auf der Abbildung zu messen kann ebenfalls dazu beitragen, die spezifischen Sondenprobleme zu überwinden. In einigen Fällen weist eine Sonde, die zu einer gewissen DNA-Sequenz paßt, tatsächlich eine geringe Spezifität zu einer anderen (gewöhnlich ähnlichen) Sequenz auf und hybridisiert mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit ebenfalls mit der zweiten Sequenz. Dies führt zu der falschen Erscheinung von zu vielen Sonden
10 eines gewissen Typs. Das Fluoreszenzspektrum ist jedoch in dem zweiten Fall sehr leicht in Bezug auf das erste aufgrund einer kleinen Änderung in der chemischen Umgebung der Sonde verschoben. Das SpectraCube™-System kann dank seiner spektralen Auflösung und Empfindlichkeit dieses Artefakt beseitigen. Ein ähnliches Artefakt besteht für Sonden, die während der Probenvorbereitung nicht ausgewaschen werden und zur falschen positiven
15 Diagnose beitragen. Das SpectraCube™-System kombiniert mit der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung hilft deshalb bei der Verringerung des Risikos von falschen Diagnosen.

Auf eine große Anzahl oder ähnliche Farbstoffe verallgemeinern zeigen die Beispiele der Figuren 5a-b und 6a-c, dass es möglich ist, eine große Anzahl von Sonden nachzuweisen und zu unterscheiden und vorausgesetzt, dass es kleine spektrale Differenzen zwischen ihnen gibt, wird
20 das SpectraCube™-System sie in einer Erfassung nachweisen und identifizieren.

Für den Fachmann ist es klar, dass andere und/oder zusätzliche bekannt und bislang noch zu entdeckende oder zu entwickelnde Fluorophore und Fluorophorkombinationen bei unterschiedlichen, wie vorstehend detailliert geschilderten FISH-Anwendungen verwenden werden können, um eine große Anzahl von Loci gleichzeitig nachzuweisen, jedes Chromosom
25 eines Karyotypen in einer unterscheidbaren Farbe anzufärben etc. Eine Liste von in der Zell- und Molekularbiologie als Stand der Technik verwendeten Fluorophoren kann bei Kasten, Introduction to fluorescent probes: Properties history and applications, in Fluorescent and luminescent probes for biological research, Mason Ed. Academic Press Limited, London (1993), 24-31 gefunden werden. Für den Fachmann ist es ebenfalls klar, dass andere Markierungstechniken, wie beispielsweise Biolumineszenz und Chemolumineszenz und ebenfalls nicht
30 fluoreszierende Markierungsstrategien ähnlich angewendet werden können.

Damit erfreut sich die Verwendung des SpectraCube™-Systems für FISH-Analysen eines großen Vorteils, wie folgt. Das SpectraCube™-System ermöglicht aufgrund seiner hohen, spektralen Auflösung den gleichzeitigen Nachweis von zahlreichen Sonden, während die
35 Verwendung herkömmlicher Mittel, um FISH durchzuführen (beispielsweise die Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops) die Anzahl der Sonden, die in einer einzigen Hybridisierung verwendet werden sollte, auf zwei bis vier Sonden begrenzt. Deshalb spart der Einsatz des SpectraCube™-Systems für FISH-Analysen Aufwand und Zeit. Weiterhin wird bei dem Einsatz

240101

46

des SpectraCube™-Systems für FISH-Analysen eine kleinere Zellenanzahl für eine vollständige Analyse erfordert, was bei den Fällen eine wichtige Eigenschaft ist, bei denen die Anzahl der zu untersuchenden Zellen begrenzt ist.

DE 295 24 210 U1

Beispiel 2

Gleichzeitige Visualisierung aller menschlicher Chromosomen in verschiedenen Farben unter der Verwendung von fluoreszierender *in situ* Hybridisierung und spektralen Bio-Abbildern

5 Die Entstehung der Vielfarben-FISH hat die Anwendungen der molekularen Zellgenetik in Grundlagenforschung und genetischer Diagnose erweitert. Alle existierenden Mehrfarben-FISH-Techniken erfordern die Verwendung fluoreszierender Sonden, deren Emissionspektren mit optischen Filtern getrennt werden können. [Ried et al., Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital
10 imaging spectroscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1388-1392; und Ried, Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung in der genetischen Diagnostik, Fakultät für theoretische Medizin, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Jan. 1994)]. Diese Anforderung beschränkt die Anzahl an Farbstoffen, die in einer gegebenen Probe unterschieden werden können. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein neuer Ansatz für FISH bereitgestellt, der das SpectraCube™ und das
15 Verfahren der vorliegenden Erfindung zum Erfassen und Analysieren mehrfach spektral überlappender, markierter Sonden (einfach und kombinatorisch) einsetzt. Bei diesem Beispiel wird spektrale Bio-Abbildung, die, wie vorstehend gezeigt, eine Kombination der Fourier-Spektroskopie, der CCD-Abbildung und optischer Mikroskopie ist, die die Erfassung von definitiven, spektralen Daten gleichzeitig bei allen Punkten einer biologischen Probe ermöglicht, verwendet, um auf Hybridisierung basierende Mehrfarben-Banden aller (d.h. 24) Typen
20 menschlicher Chromosomen sichtbar zu machen und eine Farbzuzuordnung des menschlichen Karyotyps zu erzeugen.

Folglich wurden 24 Chromosomen-Anfärbungsmittel (1 bis 22, X und Y, Tabelle 4), die jeweils mit einer unterschiedlichen Kombination von fünf oder weniger unterschiedlichen
25 Fluorophoren markiert wurden, ausgewählt aus einem Satz von fünf Fluorophoren (a bis e, Tabelle 3) (siehe Tabelle 3 für die unterschiedlichen Fluorophore und ihre spektralen Kennzeichen und Tabelle 2 für die Zuweisung der, in Tafel 3 aufgeführten Fluorophore zum Erzielen der 24 Chromosomen-Anfärbungsmittel) gleichzeitig mit menschlichen Chromosomen in der Mitosespreizung von männlichen weißen Blutkörperchen hybridisiert, die im wesentlichen
30 wie in Ried et al. beschrieben [Ried et al., Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging spectroscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1388-1392] für eine Hybridisierung vorbereitet worden waren. Hybridisierte Chromosomen wurden durch ein invertiertes, mit dem SpectraCube™ System verbundenes Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und wurden analysiert.

Tabelle 3

Fluorophor	Symbol	Anregung (nm)
FITC	a	475-495
Cy2 TM 1	b	475-495
Cy3 TM 1	c	540-570
Texas-Rot	d	540-570
Cy5 TM 1	e	630-670

1 von Amersham

5

Tabelle 4:

Chromosom	Chromosomen-Anfärbungsmittel	Fluorophore
Menschliches Chromosom 1	1	b, c, d
Menschliches Chromosom 2	2	E
Menschliches Chromosom 3	3	a, c, d, e,
Menschliches Chromosom 4	4	c, d
Menschliches Chromosom 5	5	a, b, d, e
Menschliches Chromosom 6	6	b, c, d, e
Menschliches Chromosom 7	7	b c
Menschliches Chromosom 8	8	D
Menschliches Chromosom 9	9	a, d, e
Menschliches Chromosom 10	10	c, e
Menschliches Chromosom 11	11	a, c, d
Menschliches Chromosom 12	12	b e
Menschliches Chromosom 13	13	a, e
Menschliches Chromosom 14	14	B
Menschliches Chromosom 15	15	a, b, c
Menschliches Chromosom 16	16	b, d
Menschliches Chromosom 17	17	C
Menschliches Chromosom 18	18	a, b, d
Menschliches Chromosom 19	19	a, c
Menschliches Chromosom 20	20	A
Menschliches Chromosom 21	21	d, e
Menschliches Chromosom 22	22	b, c, e
Menschliches Chromosom X	X	a, e
Menschliches Chromosom Y	Y	c, d, e

10

Nun mit Bezug auf die Figuren 7a-e, 8a-b und 9a-b zeigen die Figuren 7a-e normierte Spektren von 24 einzelnen Pixeln, wobei jeder einem unterschiedlichen Typ eines menschlichen Chromosoms (1-22, X und Y) entspricht. Die Zahlen 1 bis 22 und die Buchstaben X und Y beziehen sich auf den Chromosomentyp, von dem jedes der dargestellten Spektren hergeleitet

15

wird. Es ist festzustellen, dass das von jedem der 24 menschlichen Chromsomen erhaltene, wie in den Figuren 7a-e gezeigte Spektrum sich von allen anderen Spektren unterscheidet. Diese Differenz kann groß (vergleiche beispielsweise den ca. 530 nm-Emissionspeak von Chromosom 15 und 11 in Figur 7c) oder klein (vergleiche beispielsweise den Emissionspeak bei ca. 530 nm von Chromosom 22 und Y in Figur 7e) sein und kann in einigen spektralen Bereichen sogar verschwinden (vergleiche beispielsweise den Emissionspeak bei ca. 680 nm von Chromosom 22 und Y in Figur 7e). Trotzdem kann, wie in den Figuren 7a-e weiterhin gezeigt wird, selbst eine winzige Differenz zwischen sehr ähnlichen Spektren unter der Verwendung des SpectraCube™-Systems und der erfindungsgemäßen Vorrichtung nachgewiesen werden. Es ist jedoch aus der Beschreibung klar, dass die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Vorrichtung, Differenzen zwischen Spektren nachzuweisen, bislang zu einem großen Ausmaß von passenden Fluorophoren und ausgewählten Fluorophorkombinationen abhängt, wie von dem Fachmann und selbst dem Experten erkannt wird, wobei die hier nachgewiesene Fähigkeit weit über den Stand der Technik der zytogenetischen Technik hinausgeht.

Figur 8a zeigt eine RGB-Abbildung von damit beschrieben, angefärbten menschlichen Chromosomen, während Figur 8b einen farbigen, menschlichen, von den angefärbten Chromosomen in Figur 8a hergeleiteten Karyotypen zeigt. Da es nicht möglich ist, 24 verschiedene Farben mit Worten zu beschreiben, werden ebenfalls die farbigen Figuren 9a und 9b beigelegt, die ansonsten zu den entsprechenden Schwarz/Weiß-Figuren 8a und 8b identisch sind. Es ist festzustellen, dass jedes der Chromosomenpaare in einer andern Farbe angefärbt ist und dass der Farb-Karyotyp (Figur 9b) direkt von der Farbabbildung (9a) hergeleitet ist.

Der verwendete Algorithmus, um die Abbildung von Figur 8a und 9a zu erhalten, war ein wie vorstehend beschriebener und in Figur 4 mit Beispielen erläuterter RGB-Algorithmus, bei dem $R = 640-760$ nm, $G = 550-640$ nm und $B = 530-550$ nm gilt. Um jedoch eine einheitlichere Abbildung in Bezug auf Intensitäten zu erhalten, wird eine spezielle Modifikation der erhaltenen RGB-Werte durchgeführt. Diese Modifikation, die in der Farbabbildungs-Technik als „Kontrast-Strecken“ bekannt ist [siehe beispielsweise ENVI™ User's guide, The enviroment for visualizing images, BSC limited Liability Company, Version 1 (1. July 1994), schließt ein (a) Bestimmen der Verteilung von jedem der RGB-Werte, (b) Definieren einer Nachschlagetabelle zum Maximieren der Differenzen zwischen den Intensitäten innerhalb der bestimmten Verteilung und (c) Anzeigen der modifizierten RGB-Abbildung, die nun eine maximale Farbvielfalt für jedes ursprüngliche, unterschiedliche Spektrum aufweist. Diese einfache Modifikation der ursprünglichen RGB-Abbildung ist eigentlich eine begrenzte Version eines wie vorstehend beschriebenen Einteilungsalgorithmuses. Für einen Fachmann ist jedoch klar, dass sich andere Algorithmen zum Zweck des Anzeigen ähnlicher Abbildungen gleich gut oder besser eignen können. Wie hier vorstehend detailliert und mit Beispielen erläutert (beispielsweise Beispiel 1), wird die Einteilungszuordnung ermöglichen, jedes der menschlichen Chromosomen in einer

bestimmten künstlichen Farbe zu zeigen, um ein noch chromosomeneigenes Farbmuster zu erhalten. Wie weiter vorstehend detailliert erklärt wird, kann eine Hauptkomponentenanalyse ebenfalls geeignet sein, wobei jede sinnvolle Komponente oder Kombination davon einer unterschiedlichen, vorbestimmten, künstlichen Farbe zugeordnet werden kann. Zusätzliche

5 Algorithmen, die fähig zum Unterscheiden ähnlicher Spektren und zum Zuordnen einer unterschiedlichen, bestimmten, künstlichen Farbe (oder Pseudo-Farbe) zu Pixeln mit unterschiedlichen Spektren, können ebenfalls zum erfindungsgemäßen Farbkaryotyping geeignet sein.

Bei diesem Beispiel wird die Verwendung von 24 unterschiedlichen einzelnen und kombinatorischen Sonden, die aus fünf unterschiedlichen Basis-Fluorophoren (a bis e, Tabelle 3) kombiniert sind, für ein menschliches, farbiges Chromosomenkaryotyping gezeigt. Trotzdem weisen

10 andere Arten eine größere Chromosomenanzahl auf, die vielleicht die Verwendung von komplizierteren, kombinatorischen Sonden erfordern, die aus mehr Basis-Fluorophoren kombiniert sind. Es sollte festgestellt werden, dass Chromosomen, einschließlich menschlicher Chromosomen, bislang ebenfalls in Größengruppen eingeteilt werden können, die bei manchen Anwendungen

15 den Bedarf nach so-vielen unterschiedlichen Farben minimieren, da zu einer Größengruppe gehörende Chromosomen, die ähnlich gefärbt sein können, nun leicht gemäß ihrer relativen Größe erkannt werden können.

Beispiel 3

20 Nachweis mehrfacher Chromosomentranslokationen in Brustkrebszellen

Wie gezeigt, kann die erfindungsgemäße Vorrichtung einen vollständigen Farb-Karyotypen normaler Blutzellen bereitstellen. In vielen Fällen wird herkömmliches Karyotypisieren (beispielsweise unter Verwendung von G-Bandenfärbungs- oder R-Bandenfärbungstechniken) verwendet, um chromosomale Abweichungen, wie mit genetischen Fehlern assoziierte Translokationen (beispielsweise 21q22-Trisomie beim Down-Syndrom, Trisomie des Chromosoms 18

25 (oder eines Fragments davon) und Trisomie des Chromosoms 13 (oder eines Fragments davon) oder Bösartigkeiten (beispielsweise eine Translokation zwischen den distalen Enden der Chromosomen 9 und 22 in Leukozyten von Patienten mit chronischer, myeloische Leukämie und eine Translokation der Chromosomen 8 und 14 in Lymphozyten bei Patienten mit Burkitt's

30 Lymphom). Bei diesem Beispiel werden die Fähigkeiten des SpectraCube™-Systems kombiniert mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung vorgeführt, um mehrfache Chromosomentranslokationen in Brustkrebszellen nachzuweisen.

Nun werden mit Bezug auf die Figuren 10a-b, 11a-b, 12 und 13 Chromosomen erweiterungen von Brustkrebszellen mit den 24 Chromosomen-Fäsern (1 bis 22, X und Y)

35 hybridisiert, wie in den Figuren 3 und 4 detailliert beschrieben ist, und spektral abgebildet, wie unter dem vorstehenden Beispiel 2 detailliert beschrieben ist. Die Figuren 10a und 11a zeigen DAPI-R-Bandenfärbung einer Chromosomenextension, wie sie unter Verwendung eines

herkömmlichen Fluoreszenzmikroskops photographiert wird. Es wird anerkannt, dass, obwohl der resultierende Karyotyp zu einem großen Ausmaß abnormal ist, es unmöglich ist, spezifische Chromosomentranslokationen in den Figuren 10a und 11a zu identifizieren. Die Figuren 10b und 11b zeigen (entsprechend in Schwarz/Weiß und Farbe) eine RGB-Abbildung der gleichen Erweiterung wie sie unter Verwendung des SpectraCubeTM-Systems und der erfindungsgemäßen Vorrichtung erhalten wird. Beim Vergleich mit den Figuren 9a-b, die einen normalen menschlichen Karyotyp zeigen, der andererseits unter identischen experimentellen Bedingungen hergeleitet wird, ist es offensichtlich, dass viele der in den Figuren 10b und 11b gezeigten Chromosomen enthaltende Abweichungen Teile von verschiedenen normalen, menschlichen Chromosomen enthalten. Die verlagerten Chromosomen (rechts) der Figuren 10b und 11b werden entlang der R-Banden-gefärbten Chromosomen (links in den Figuren 12 und 13) gezeigt. Es ist festzustellen, dass manche der verlagerten, in den Figuren 12 und 13 gezeigten Chromosomen Fragmente einschließen, die von zwei, drei und sogar vier verschiedenen Chromosomen stammen. Da spezifische Chromosomentranslokationen und andere chromosomale Abweichungen (beispielsweise Gen-Amplifikation) bis vor kurzem mit frühen oder Zustands-spezifischen Bösartigkeiten assoziiert wurden und da die erfindungsgemäße Vorrichtung die Fähigkeit, derartige Translokationen und Abweichungen nachzuweisen und zu kennzeichnen, enorm steigert, wird die Fähigkeit der Früherkennung und der Stadieneinteilung von Bösartigkeiten bei Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung profitieren. Weiterhin wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ermöglichen, bislang neue Chromosomen-spezifische Abweichungen (beispielsweise Translokationen) festzustellen, die wiederkehrend mit spezifischen Bösartigkeiten assoziiert werden und möglicherweise einen umfassenden Umgang für derartige Translokationen bereitzustellen. Zusätzlich können derartige wiederkehrende Abweichungen zur Isolierung von Genen führen, die durch Aktivierung oder Inaktivierung mit den bösartigen Prozessen assoziiert sind.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig fest zustellen, dass die bei diesem und in dem vorherigen Beispiel 2 (wie in Tabelle 3 aufgelistet und in den Figuren 7a-c) eingesetzten Fluorophore gemeinsam in dem Bereich von 480-730 nm emittieren. Damit kann DAPI gleichzeitig für Kontrastfärbung verwendet werden, da ihre Emission im blauen, deutlich unterhalb dieses Spektralbereichs liegt. Damit ist es möglich, wie in den Figuren 10a-b, 11a-b, 12 und 13 gezeigt, die genau gleichen Chromosomen-Spreizung unter Verwendung des herkömmlichen, monochromatischen R-Bandenfärbung-Ansatzes und des erfindungsgemäßen Mehrfarben-Ansatzes gleichzeitig zu beobachten. Es ist klar, dass das SpectraCubeTM-System dazu in der Lage ist, eine herkömmliche DAPI-R-Bandenfärbungsabbildung durch Begrenzen des untersuchten spektralen Bereich auf blau bereitzustellen. Damit kann zu Vergleichszwecken, eine einzelne Chromosomen-erweiterung unter Verwendung des SpectraCubeTM-Systems und der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung sowohl als DAPI R-Banden-gefärbten Karyotyps als auch als Farb-

Karyotyp betrachtet werden. Somit kann der DAPI R-Banden-gefärbten Karyotyp zusätzliche Information bereitstellen und sehr genau die Region(en) (d.h. Banden) jedes spezifischen, in einem spezifischen Translokationereignis eingeschlossenen Chromosoms aufzeigen, wenn Chromosomentranslokationsergebnisse mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung untersucht werden.

5

Beispiel 4

Zusätzliche FISH-Anwendungen

Aufgrund der vorstehenden Beschreibungen ist klar, dass (1) mehrere Sondentypen für FISH verwendet werden können, wobei diese Loci-spezifische Sonden, Chromosomen-Anfärbungsmittel und ganze Genome einschließen, (2) die analysierten Chromosomen aus der Interphase, Mitose oder Meiose sein können und (3) Dutzende von Sonden aller Typen zu den Chromosomen gleichzeitig hybridisiert werden können und dass unter der Voraussetzung, dass jede der Sonden ein ein wenig unterschiedliches Spektrum aufweist, das SpectraCubeTM-System, wie es in der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung verwendet wird, jede der Sonden spektral nachweisen und ihre räumliche Anordnung durch Zuschreiben der Pixel darstellen kann, die jedes der Spektren mit einer RGB-Farbe (d.h. Pseudo-Farbe) oder einer vorbestimmten, künstlichen Farbe darstellt.

Damit kann beispielsweise eine einzige Durchführung angesetzt werden, um das/die Gen/e zu deren chromosomalen Banden zuzuordnen, falls die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung zum Zuordnen eines neu isolierten Gens oder neu isolierter Gene (oder anderer DNA-Sequenzen) verwendet wird. Beispielfür zwei neue Gene können aus diesem Grund 26 unterschiedliche Sonden wie folgt vorbereitet werden: 24 Chromosomen-Anfärbungsmittel und zwei Loci-spezifische Sonden (d.h. die neu isolierten, fluoreszierend markierten Gene). Die Sonden werden dann vermischt und vorzugsweise mit mitotischen Chromosomen gleichzeitig hybridisiert, die ebenfalls DAPI-kontrastgefärbt sind. Das Ergebnis ist ein, zu dem in Figur 9b dargestellten ähnlicher 24 (für einen männlichen oder 23 für einen weiblichen)-Farb-Karyotyp, auf dem zwei Loci-spezifische Signale (Punkte, die den Loci-spezifischen Sonden zugeschrieben werden) in nun zwei unterschiedlichen Farben die Chromosomenlokationen der neu isolierten Gene hervorzuheben, die dann mit einer spezifischen chromosomalen Bande durch Erzeugen einer R-Banden-gefärbten, wie vorstehend erklärten, Abbildung assoziiert werden.

In vielen Fällen werden ein paar wenige Loci-spezifische Sonden einer einzigen chromosomalen Bande zugeordnet, wobei bislang nicht bestimmt wurde, welche distal und welche proximal liegt. Unter Verwendung der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung zum gleichzeitigen Nachweis der wenigen Sonden, wobei jede in einer unterschiedlichen RGB oder einer anderen künstlichen Farbe erscheint, wird es in vielen Fällen möglich sein, die relative Anordnung von nahe kartierten Sequenzen zu bestimmen.

Das SpectraCubeTM-System und die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung können eben-

falls dazu verwendet werden, um dreidimensionale Anordnungen von Interphasenchromosomen nachzuweisen. Der Leser wird erneut auf die Figuren 8a und 9a verwiesen. In der oberen rechten Ecke werden mit dem in der vorstehenden Tabelle 4 aufgelisteten Chromosomen-Anfärbungsmittel hybridisierte Zellkerne während der Interphase (mit NI gekennzeichnet) dargestellt. Die

5 Untersuchung des Farbmusters dieser Zellkerne enthüllt eine einzigartige Eigenschaft. Es ist beispielsweise festzustellen, dass die beiden Chromosom 2-Paare (in rot) in dem unteren Teil der Zellkerne angeordnet sind und dass die Chromosom 6-Paare (in purpur) beide am entgegengesetzten Pol angeordnet sind. Bis jetzt ist über die Chromosomenorganisation während der

10 Interphase wenig bekannt. Es kann jedoch rational vermutet werden, dass während der Interphase in bösartigen Zellen Änderungen bei der Chromosomenorganisation auftreten. Damit kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung von außerordentlichem Wert zur Früherkennung von verschiedenen Bösartigkeiten, Bestimmen des Stadiums einer bösartigen Krankheit und somit einer besseren Behandlungsanpassung für untersuchte Patienten etc. sein. Es sollte festgestellt werden, dass die Verwendung des SpectraCube™-Systems kombiniert mit der Vorrichtung der

15 vorliegenden Erfindung und einem Mittel zur dreidimensionalen Rekonstruktion (beispielsweise einem konfokalen Mikroskop) verwendet werden kann, um dreidimensionale Information der Chromosomenorganisation während der Interphase zu erhalten.

Viele Krebsarten und genetische Fehler werden durch Chromosomendeletion, Translokationen und andere Umordnungen und grobe Anomalitäten (beispielsweise Genamplifikation)

20 gekennzeichnet. Wie im vorstehenden Beispiel 3 vorgeführt, wird die Verwendung der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung die Fähigkeit vergrößern, derartige Abnormalitäten nachzuweisen. Weiterhin ist es klar, dass die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung für vergleichende genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) und für umgekehrte Chromosomenanfärbung sehr geeignet ist, wie vorstehend beschrieben wird.

25 Eine der allgemeinen, chromosomalen Abweichungen wird mit dem Down-Syndrom assoziiert. Vor langer Zeit wurde festgestellt, dass das Down-Syndrom aus der Trisomie des Chromosoms 21 resultiert. Eine sorgfältigere Untersuchung enthüllte, dass ein spezifischer Bereich des Chromosoms 21 (21q22) immer mit diesem allgemeinen Syndrom assoziiert wird (d.h. bei Trisomie auftritt). Bei einigen Fällen ist jedoch der Karyotyp des mit dem Down-

30 Syndrom betroffenen Individuums offensichtlich normal, wenn er durch herkömmliche G- oder R-Bandenfärbungstechniken für Karyotypisierung bestimmt wird. Die weithin anerkannte Erklärung für dieses Phänomen liegt darin, dass in diesen Fällen die Trisomie von einem Fragment stammt, das von dem 21q22-Chromosomenbereich hergeleitet wird, dessen Fragment klein und unter der Auflösung der herkömmlichen Bandenfärbungstechniken liegt. Die Ver-

35 wendung des SpectraCube™-Systems kombiniert mit der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ermöglicht, diese bis dahin nicht nachweisbaren Chromosom 21 Trisomien in embryonischen, beispielsweise über Probenvorbereitung von Chrionzotten-Zellen, nachzuweisen

und eine fundiertere genetische Beratung für Frauen mit hohem Risiko zu ermöglichen. Es ist festzuhalten werden, dass die Chromosomen 13 und 18 oder Fragmente Berichten zufolge ebenfalls bei Trisomien auftauchen, die in der Geburt von auffallend anormalen Kindern resultieren und dass die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ähnlich zur pränatalen Diagnose dieser negativen Trisomien der Chromosomen 13 oder 18 angewendet werden kann.

Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kombiniert mit den sich schnell entwickelnden Techniken zum Abtrennen embryonischer Zellen aus dem peripheren Blut einer schwangeren Frau wird für das pränatale Karyotypisieren mit niedrigem Risiko zum Nachweis von Chromosom 21 Trisomien und anderen weniger häufigeren Chromosomenanomalitäten von großem Wert sein.

Die Verwendung des SpectraCube™-Systems und der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kombiniert mit Telomer-spezifischen Chromosomensonden, wobei jedes Telomer (48 bei männlichen Menschen, 46 bei weiblichen) in einer unterschiedlichen Farbe erscheint, wird eine vergleichende Studie aller Telomere in einer untersuchten Art ermöglichen.

In der Studie der entwicklungsverwandten Arten und in der Studie für Modellsysteme (beispielsweise Maus als Modellsystem für Mensch) ist es bei vielen Fällen erforderlich, vergleichende Genomzuordnungen zu erhalten, bei denen Chromosomen von zwei oder mehr Arten gemäß ihrer Sequenzähnlichkeiten und damit ihrer Chromosomen getragenen, genetischen Information ausgerichtet sind. Die Verwendung der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung wird das Erlangen derartiger vergleichender Zuordnungen erleichtern. Man ziehe beispielsweise die Vorbereitung einer vergleichenden Zuordnung von Mensch-Maus-Chromosom in Erwägung. Zu diesem Zweck soll ein vollständiger Satz von Chromosomen-Anfärbungsmitteln einer der Arten (beispielsweise Mensch) mit Chromosomen-Spreizungen der anderen Art (Maus, in dem bestimmten Beispiel), wie vorstehend beschrieben, hybridisiert und analysiert werden. Das Ergebnis ist eine Abbildung eines Maus-Karyotyps, der mit den menschlichen Chromosomen-Anfärbungsmitteln angefärbt ist. Damit kann eine Ausrichtung zwischen den Karyotypen der zwei Arten gemacht werden

Viele andere Anwendungen für FISH wurden in der Fachliteratur beschrieben. Ein Beispiel ist die Studie der Genexpression, wobei man durch die Verwendung Loci-spezifischer Sonden, die mit bei Intervallen von einer synchronisierten Zellkultur erhaltenen Interphasen-Zellkernen hybridisiert sind, ihre Verdoppelungsordnung (d.h. verdoppelte Gene erscheinen als vier Punkte und nicht verdoppelte Gene erscheinen als zwei Punkte) feststellen kann, wobei, als Daumenregel, früh verdoppelnde Gene in der untersuchten Zelle ausgedrückt werden und spät verdoppelnde nicht. Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ist für diesen Analysetyp sehr gut geeignet, da Dutzende, jede ein wenig unterschiedliches Spektrum aufweisende Sonden in einer einzigen Hybridisierung, gefolgt von einem einzigen Abbildungsschritt gleichzeitig analysiert werden können, um sie alle nachzuweisen. Tatsächlich kann die Vorrichtung der

vorliegenden Erfindung für jede bisher beschriebene oder noch zu beschreibende FSIH-Anwendung verwendet werden.

Obwohl die Erfindung mit Bezug auf eine begrenzte Anzahl an Ausführungsformen beschrieben wurde, ist es klar, dass viele Variationen, Modifikationen und andere Anwendungen der Erfindung gemacht werden können.

24.01.01

24.1.2001

Gebrauchsmusteranmeldung 296 24 210.1

Anmelder: Spectral Diagnostic Ltd.

Unser Zeichen: 50409 DE

Schutzansprüche

1. Farbanzeigevorrichtung, aufweisend ein Bild aller Chromosomen oder Chromosomenabschnitte einer Zelle, wobei jedes der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren gefärbt ist, wobei das Bild die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.
2. Farbanzeigevorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Zuordnung der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte zu den unterschiedlichen unterscheidbaren Farben durch einen Algorithmus bewirkt ist, der einen RGB-Algorithmus und/oder einen Klassifikationsalgorithmus aufweist.
3. Farbanzeigevorrichtung, aufweisend ein Bild der in einer Zelle vorliegenden Chromosomen, wobei jedes der Chromosomen mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren gefärbt ist, wobei das Bild die Chromosomen in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.
4. Farbanzeigevorrichtung nach Anspruch 3, wobei die Zuordnung der Chromosomen zu den unterschiedlichen unterscheidbaren Farben durch einen Algorithmus bewirkt ist, der einen RGB-Algorithmus und/oder einen Klassifikationsalgorithmus aufweist.
5. Farbanzeigevorrichtung, aufweisend ein Bild aller in einer Zelle vorliegenden Chromosomen oder Chromosomenabschnitte, wobei das Bild die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.
6. Farbanzeigevorrichtung nach Anspruch 5, wobei die Zuordnung der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte zu den unterschiedlichen unterscheidbaren Farben durch

DE 296 24 210 01

einen Algorithmus bewirkt ist, der einen RGB-Algorithmus und/oder einen Klassifikationsalgorithmus aufweist.

- 5 7. Farbanzeigevorrichtung, aufweisend ein Bild aller in einer Zelle vorliegenden Chromosomen, wobei das Bild die Chromosomen in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben darstellt, wobei jedem der Chromosomen eine der unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zugeordnet ist.
- 10 8. Farbanzeigevorrichtung nach Anspruch 7, wobei die Zuordnung der Chromosomen zu den unterschiedlichen unterscheidbaren Farben bewirkt ist durch einen Algorithmus, der einen RGB-Algorithmus und/oder einen Klassifikationsalgorithmus aufweist.
9. Spektrale Bioabbildungsvorrichtung, aufweisend:
 - 15 a) eine Einrichtung zum Bereitstellen einer Probe mit allen Chromosomen oder Chromosomenabschnitten einer Zelle, wobei die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte hybridisiert sind mit einer Gruppe von Chromosomfarben, wobei jede Farbe eine Gruppe von Nukleinsäuresonden aufweist, die mit einem Fluorophor oder einer Kombination von Fluorophoren markiert sind, wobei
20 mindestens eine Farbe für jeden Chromosomentyp vorhanden ist und jede Farbe ein unterschiedliches Fluoreszenzspektrum aufweist;
 - b) eine Einrichtung zum Betrachten der Probe in Form eines Fluoreszenzmikroskops, wobei das Fluoreszenzmikroskop optisch verbunden ist mit einem bildgebenden Spektrometer, wobei das Fluoreszenzmikroskop und das bildgebende Spektrometer dazu dienen, ein Spektrum jedes Pixels der Probe zu
25 erhalten,
 - c) eine Einrichtung zum Sammeln einfallenden Lichtes gleichzeitig von allen Pixeln der Probe unter Verwendung einer kollimierenden Optik;
 - d) eine Einrichtung zum Leiten des einfallenden, kollimierten Lichts durch ein Interferometersystem, das eine Anzahl von Elementen aufweist, so daß das Licht zuerst aufgeteilt wird in zwei kohärente Strahlen, die sich in unterschiedlichen Richtungen innerhalb des Interferometers bewegen und sodann die zwei kohärenten Strahlen rekombiniert werden, um miteinander zu interferieren, um einen ausgehenden Lichtstrahl zu bilden;
 - 30 e) wobei der ausgehende Lichtstrahl geleitet wird durch ein fokussierendes optisches System, welches den austretenden Lichtstrahl auf einen Detektor mit einem zweidimensionalen Feld von Detektorelementen fokussiert, so daß zu
35

5 jedem Zeitpunkt jedes der Detektorelemente das Bild ein und desselben Pixels der Probe für die gesamte Zeitdauer der Messung erhält, so daß das reale Bild der Zellkerne auf der Ebene des Detektorfeldes stationär ist und zu jeder Zeit während der Messung das Bild sichtbar und erkennbar bleibt und so daß jedes der Detektorelemente ein Signal erzeugt, das eine bestimmte Linear-

10 f) eine Einrichtung zum Drehen oder Verschieben eines oder mehrerer Elemente des Interferometersystems, so daß die optische Wegdifferenz zwischen den zwei kohärenten Strahlen, die durch das Interferometersystem erzeugt werden, gleichzeitig für alle Pixels der Probe abgetastet wird; und

15 g) eine Einrichtung zum Aufzeichnen von Signalen jedes der Detektorelemente als Funktion der Zeit unter Verwendung einer Aufzeichnungseinrichtung, um einen ersten spektralen Datenwürfel zu bilden; und

20 h) eine Einrichtung zum Interpretieren des ersten spektralen Datenwürfels unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus, wodurch ein Bild geliefert wird, das die Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in unterschiedlichen unterscheidbaren Farben zeigt, wobei jede der Chromosomen oder Chromosomenabschnitte einer Farbe gemäß dessen Fluoreszenzspektrum zugeordnet ist.

25 10. Vorrichtung nach Anspruch 9, wobei die Nukleinsäuresonden loci-fragmentierte Chromosomen, künstliche Hefe-Chromosomen, die ein Insert aufweisen, Plasmide, die ein Insert aufweisen, Cosmide, die ein Insert aufweisen, Phagemide, die ein Insert aufweisen, oder virale Vektoren, die ein Insert aufweisen, oder deren Kombinationen umfassen.

30 11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluorophor ein kombinatorischer Fluoreszenzfarbstoff ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe Zellkerne während der Interphase, Zellkerne während der Mitose oder Zellkerne während der Meiose sind.

35 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzahl der Chromosomenfarbstoffe 23 oder mehr beträgt.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromosomen Interphase-Chromosomen, Chromosomen während der Mitose oder Chromosomen während der Meiose sind.
- 5
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der mathematische Algorithmus eine Punktoperations-Analyse des Spektrums jedes der Pixel in der Probe durchführt.
- 10
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, wobei die Punktoperations-Analyse die Abbildung des Spektrums jedes der Pixel in der Probe in eine skalare Größe gemäß einer Transformationsfunktion umfaßt.
- 15
17. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Punktoperations-Analyse die Abbildung des Spektrums jedes Pixels der Probe in ein anderes Spektrum gemäß einer Transformationsfunktion umfaßt.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 17, wobei der mathematische Algorithmus eine morphologische Analyse durchführt, die die relative Größe der Chromosomen in der Probe bestimmt.
- 20
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 18, wobei der mathematische Algorithmus eine Klassifikationsabbildungs-Analyse durchführt, die für das Spektrum jedes der Pixel eine spektrale Differenz gegenüber wenigstens einem Referenzspektrum berechnet.
- 25
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Klassifikationsabbildungs-Analyse ein vielfarbiges Bild erzeugt, in dem Gruppen von Pixel mit vorbestimmten maximalen Spektraldifferenzen von einem der mehreren Referenzspektra mit einer vorbestimmten künstlichen Farbe gefärbt sind.
- 30
21. Vorrichtung nach Anspruch 20, wobei die Spektraldifferenz eine skalare Größe ist, die definiert ist als das Integral über einen vorbestimmten Wellenlängenbereich des Absolutwertes der Differenz zwischen dem Spektrum jedes der Pixel und einem der mehreren Referenzspektra.
- 35

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 21, wobei der mathematische Algorithmus eine Hauptkomponenten-Analyse durchführt.
- 5 23. Vorrichtung nach Anspruch 22, wobei die Hauptkomponenten-Analyse aufweist:
- a) eine Einrichtung zum Bilden einer kovarianten Matrix für alle Pixel und Wellenlängen der Messung, die Wellenlängen der anregenden Quellen aufweist, wenn mehrere Wellenlängen verwendet werden;
 - 10 b) eine Einrichtung zum Diagonalisieren der kovarianten Matrix und zum Auffinden aller unabhängigen orthogonalen Spektralbasis-Elemente; und
 - c) eine Einrichtung zum Ermitteln, welche der Basiselemente oder eine Kombination daraus bestimmte Merkmale in der Probe kennzeichnen.
- 15 24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 23, wobei der mathematische Algorithmus eine Linearkombinations-Analyse durchführt.
25. Vorrichtung nach Anspruch 24, wobei die Linearkombinations-Analyse zur spektralen Normierung dient.
- 20 26. Vorrichtung nach Anspruch 24, wobei die Linearkombinations-Analyse die Anwendung einer gegebenen Skalargröße auf jede Wellenlänge der Spektren jedes der Pixel durch eine arithmetische Funktion aufweist, wobei die Funktion aus einer Addition, Subtraktion, Multiplikation oder Division oder Kombinationen daraus besteht.
- 25 27. Vorrichtung nach Anspruch 24, wobei die Linearkombinations-Analyse zur Hintergrundsubtraktion dient, in welcher ein Spektrum eines Pixels, das in einer Hintergrundregion der Probe angeordnet ist, von den Spektren der Pixel der Probe subtrahiert wird.
- 30 28. Vorrichtung nach Anspruch 24, wobei die Linearkombinations-Analyse ein Kalibrierungsverfahren aufweist, in dem ein vor der Betrachtung der Probe gemessenes Spektrum zum Teilen bzw. Unterteilen der Spektren der Pixel der Probe dient.
- 35 29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 28, wobei der mathematische Algorithmus ein Rot/Grün/Blau-Farbbild unter Verwendung von vordefinierten Wellenlängenbereichen berechnet.

30. Vorrichtung nach Anspruch 29, wobei das Rot/Grün/Blau-Farbbild durch einen Kontrast-Streckungs-Algorithmus modifiziert ist.
- 5 31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 30, wobei der mathematische Algorithmus ein Verhältnis zwischen den Intensitäten an zwei unterschiedlichen Wellenlängen für jedes der Spektra der Pixels berechnet.
- 10 32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 31, wobei der mathematische Algorithmus ein Verhältnis zwischen Intensitäten an zwei unterschiedlichen Wellenlängen für jedes der Spektra der Pixels berechnet und jedes der Pixels gemäß dem berechneten Verhältnis in einer helleren oder dunkleren künstlichen Farbe anfärbt.
- 15 33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 32, wobei die Vorrichtung einen Farb-Karyotypen von embryonalen Zellen, einen Farb-Karyotypen von weißen Blutzellen, einen Farb-Karyotypen von malignen Zellen oder einen Farb-Karyotypen von auf Bösartigkeit geprüften Zellen liefert.
- 20 34. Vorrichtung nach Anspruch 33, wobei die embryonalen Zellen Chorionzotten-Zellen oder embryonale Zellen sind, die von peripherem Blut einer schwangeren Frau stammen.
- 25 35. Vorrichtung nach Anspruch 34, wobei die Vorrichtung zum Erfassen einer Trisomie des menschlichen Chromosoms 21, der menschlichen Chromosomenbande 21q22, einem Fragment der menschlichen Chromosomenbande 21q22, des menschlichen Chromosoms 18, eines Fragmentes des menschlichen Chromosoms 18, des menschlichen Chromosoms 13 oder eines Fragmentes des menschlichen Chromosoms 13 dient.
- 30 36. Vorrichtung nach Anspruch 33, wobei die Einrichtung zum Liefern des Farb-Karyotyps der auf Bösartigkeit geprüften Zellen zum Erhalt einer Farb-Translokationskarte dient.
37. Vorrichtung nach Anspruch 33, wobei die Einrichtung zum Liefern des Farb-Karyotyps der bösartigen Zellen zum Erhalt einer Farb-Translokationskarte dient.

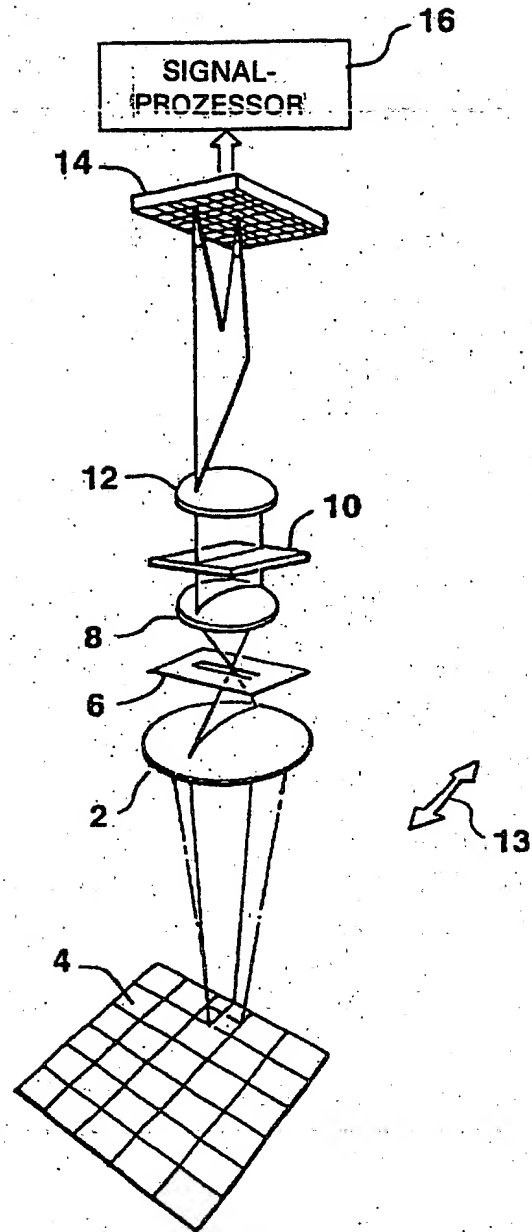


FIG. 1 (Stand der Technik)

DE 296 24 210 U1

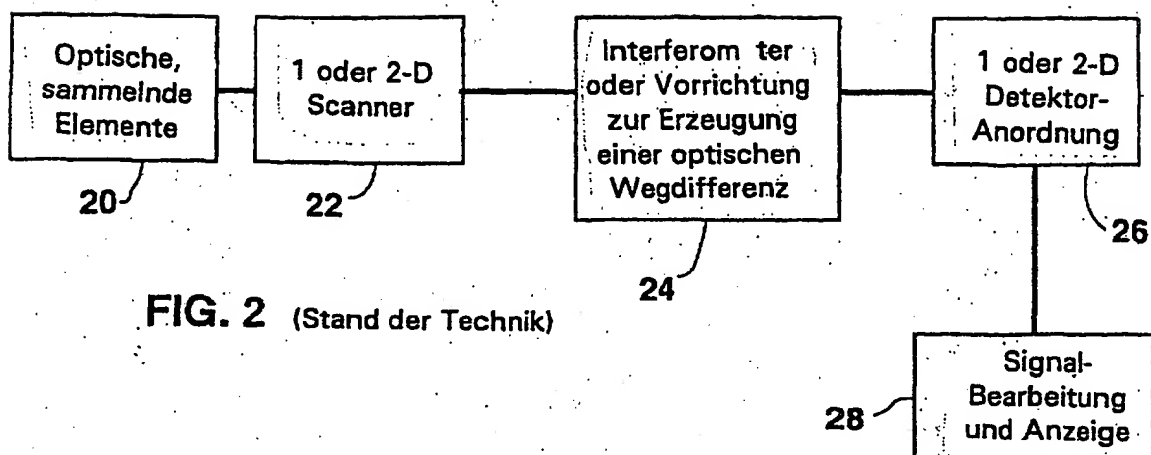
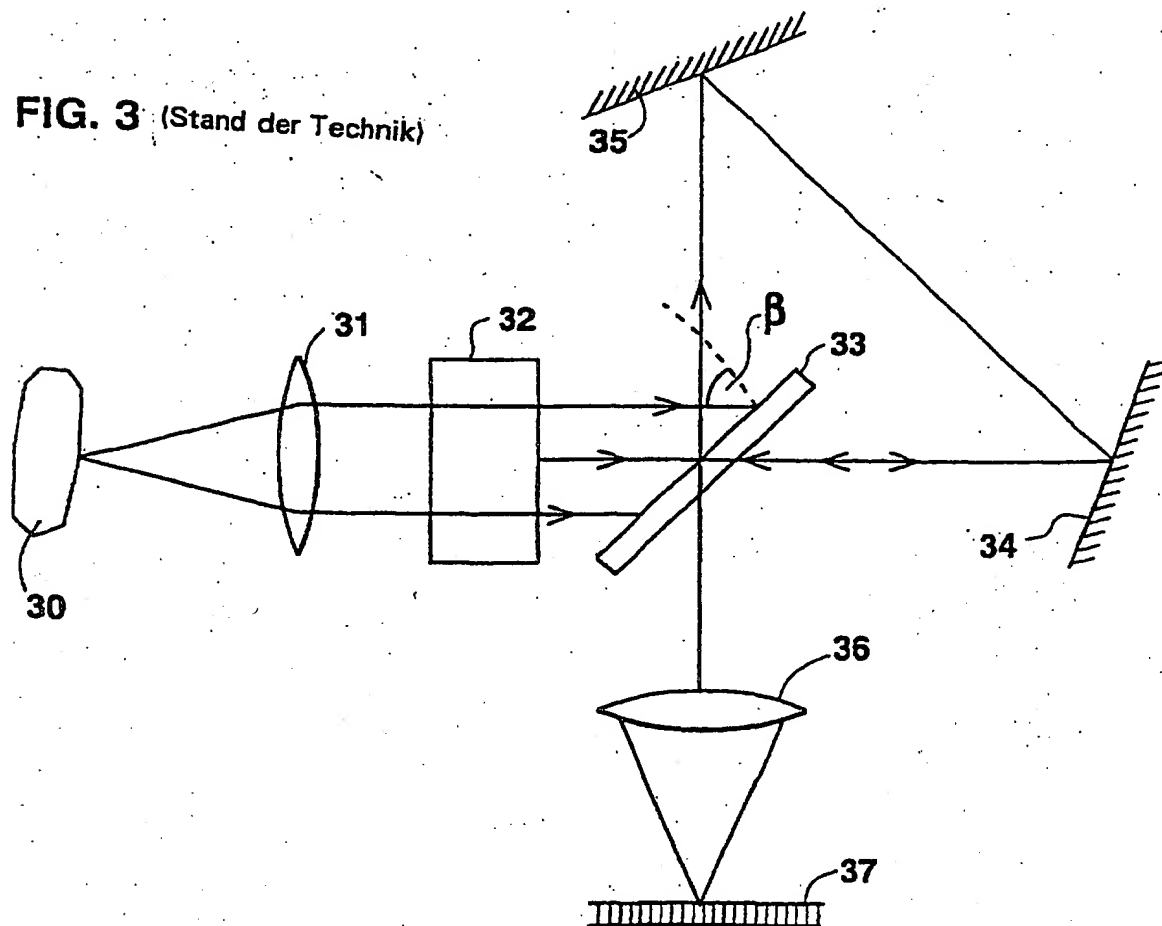
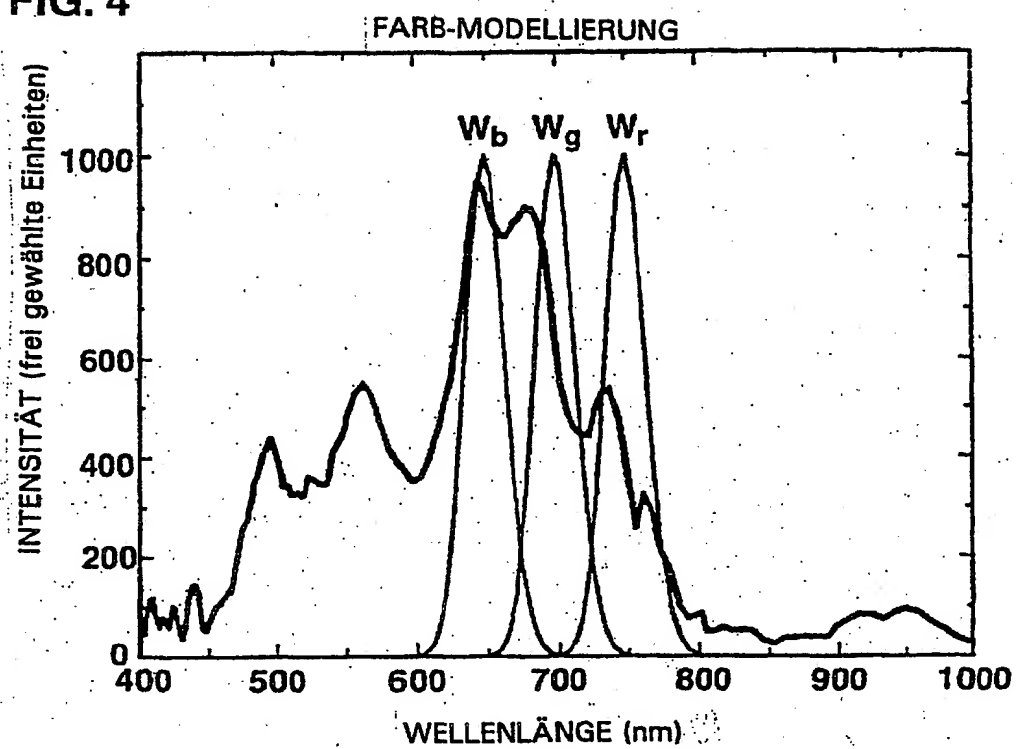


FIG. 3 (Stand der Technik)



DE 296 24 210 U1

FIG. 4



29.03.01

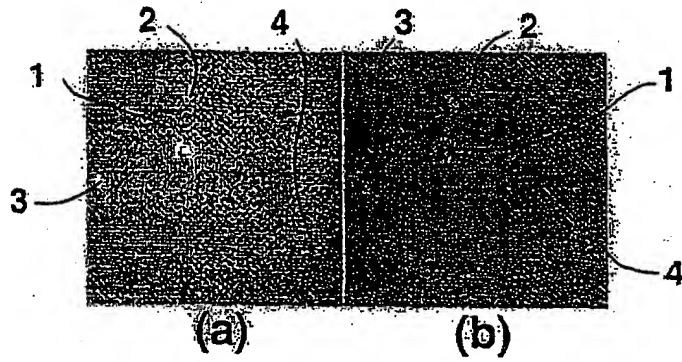
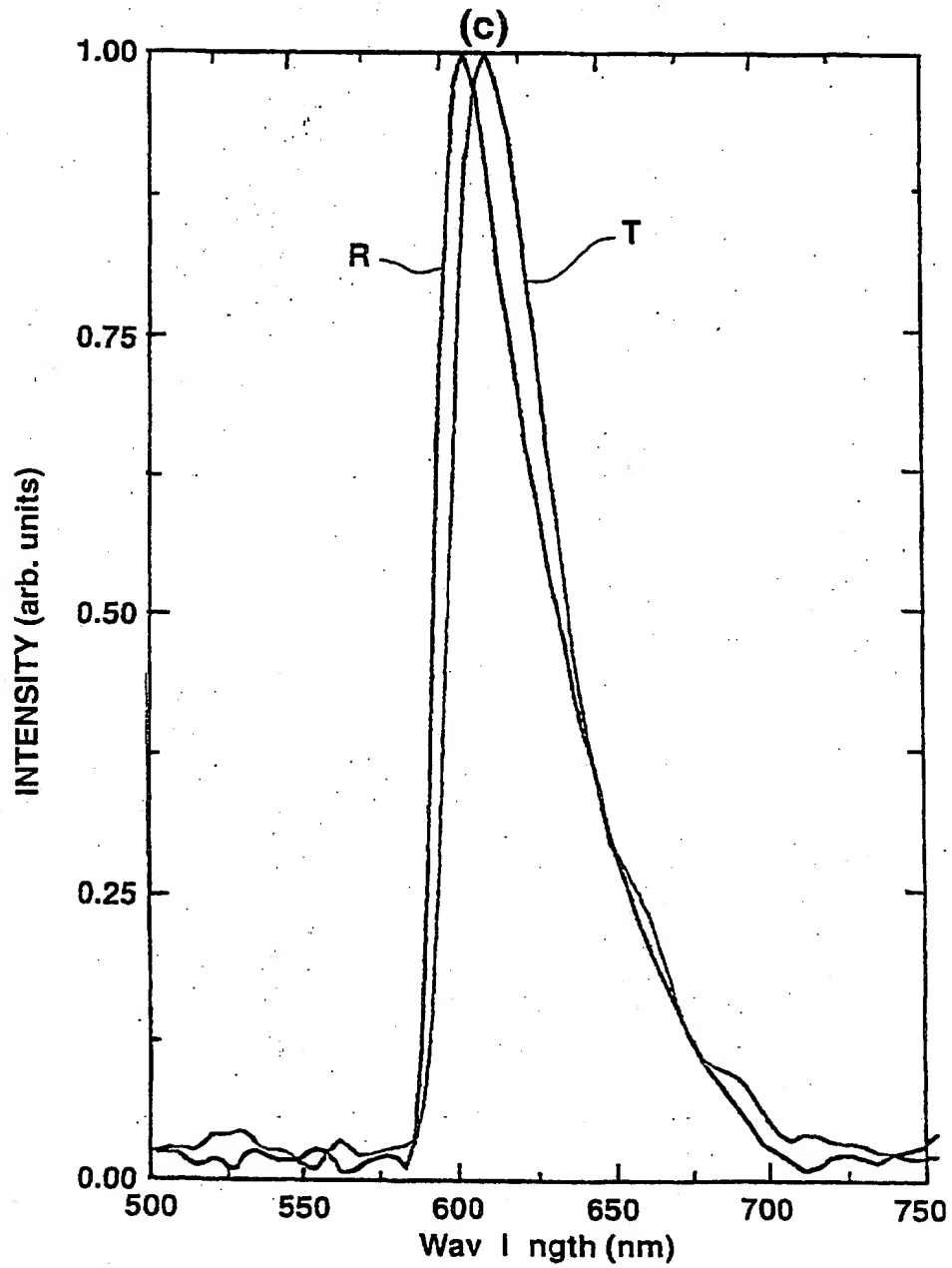


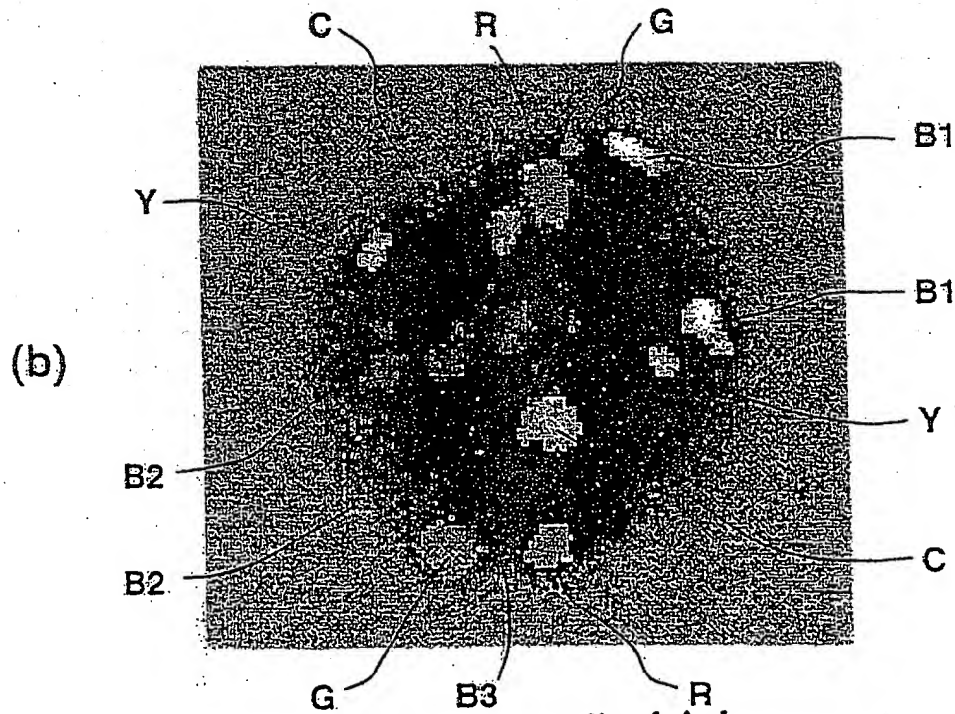
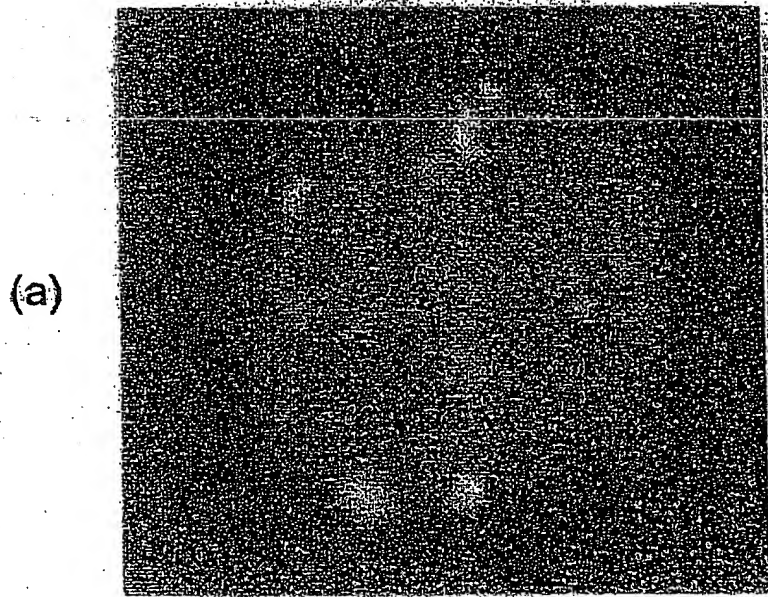
FIG. 5



DE 296 24 210 U1

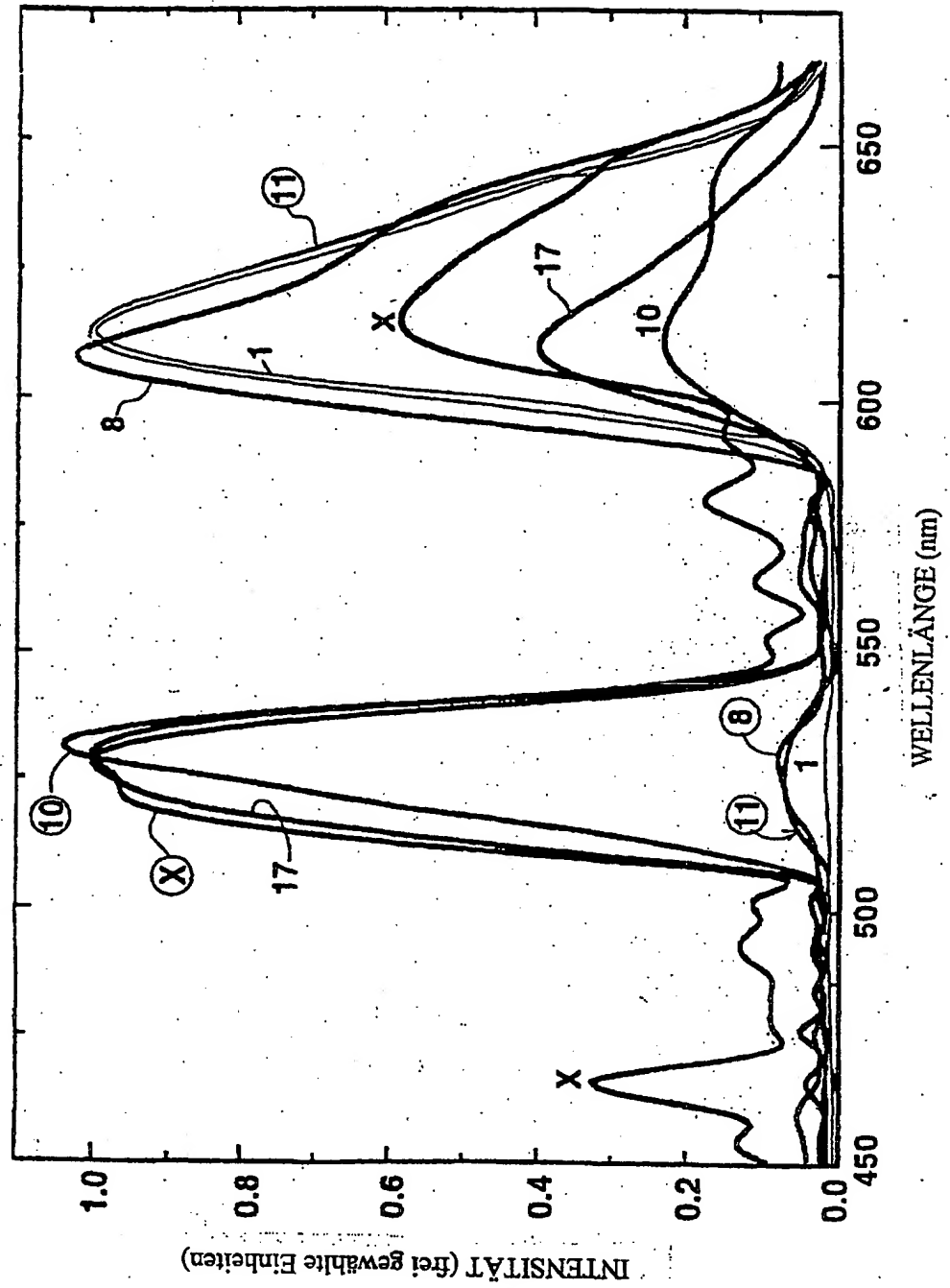
29.03.01

FIG. 6



DE 296 24 210 U1

FIG. 6c



DE 296 24 210 U1

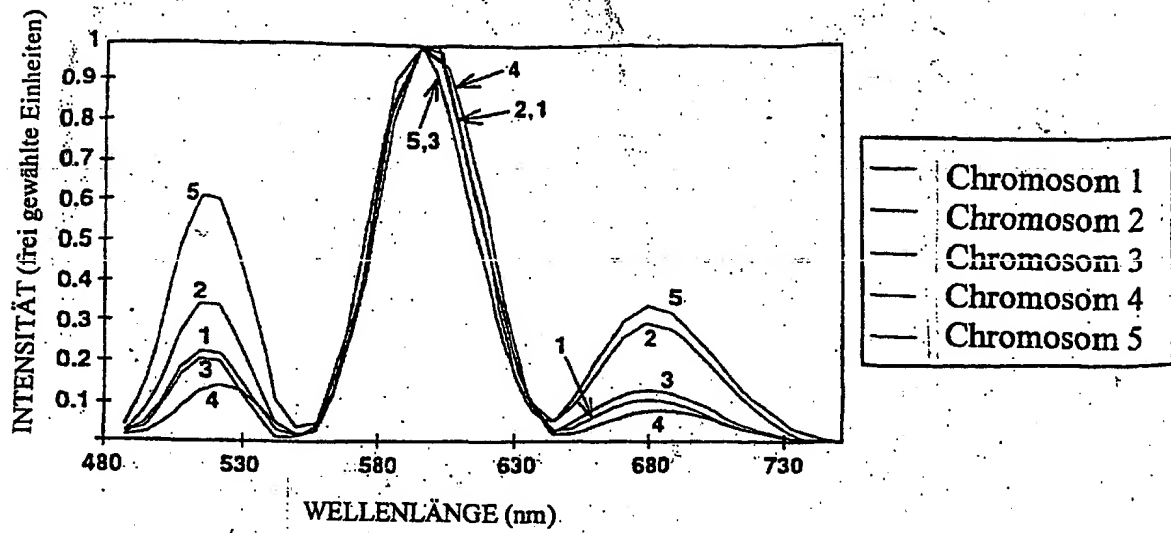


FIG. 7a

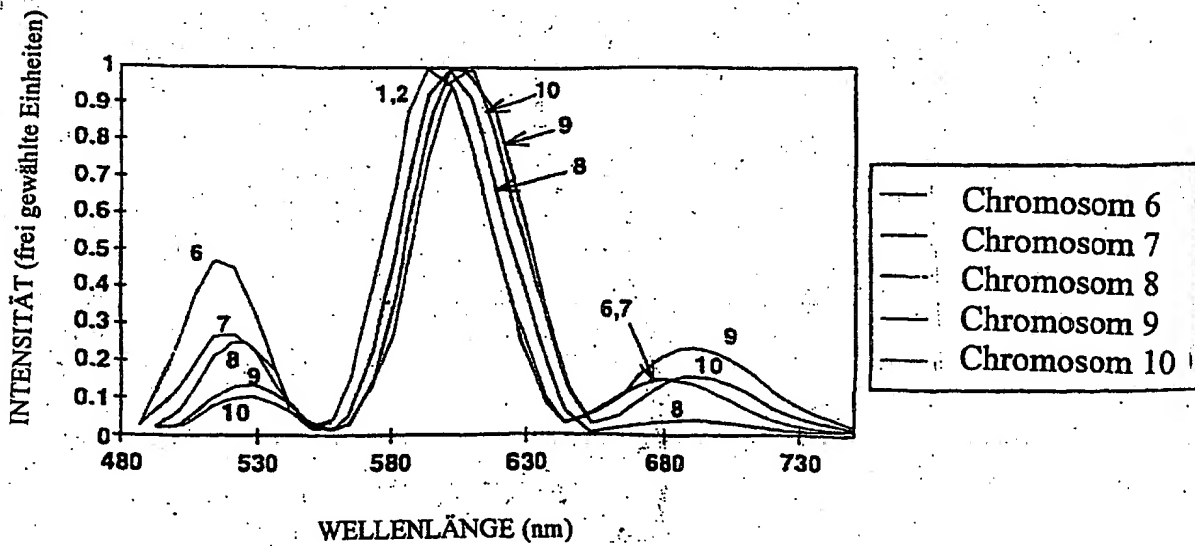


FIG. 7b

FIG. 7c

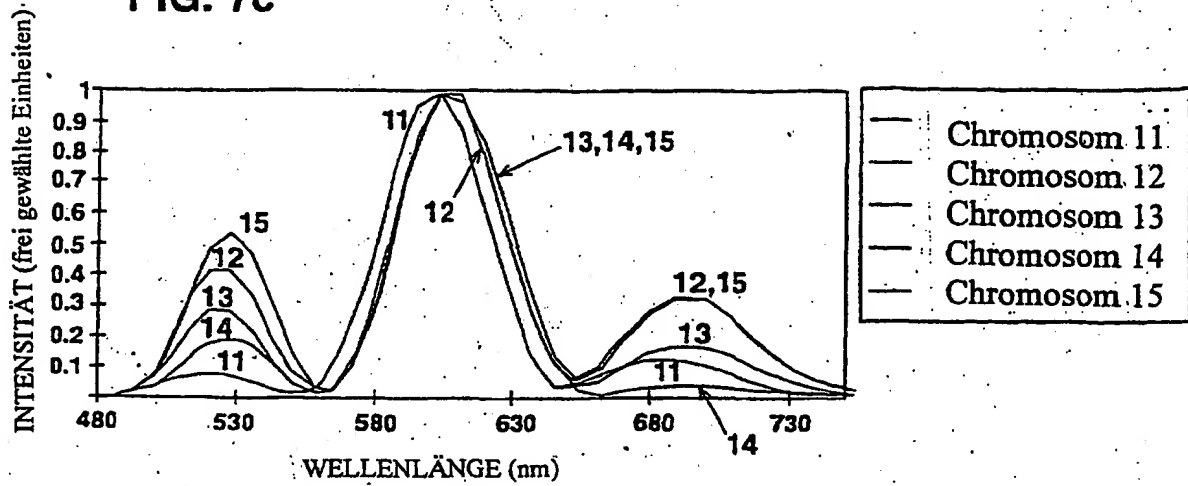


FIG. 7d

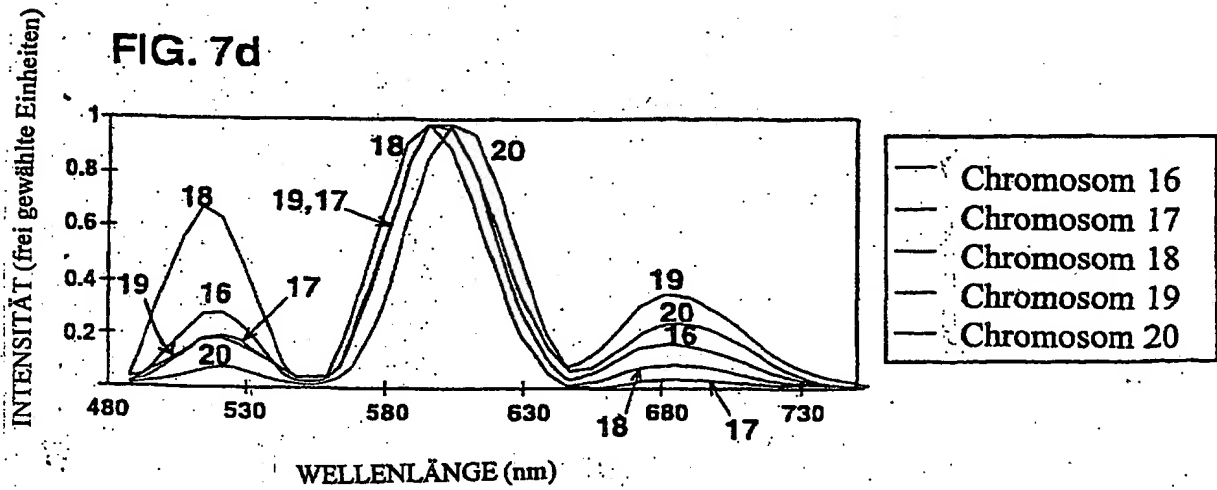


FIG. 7e

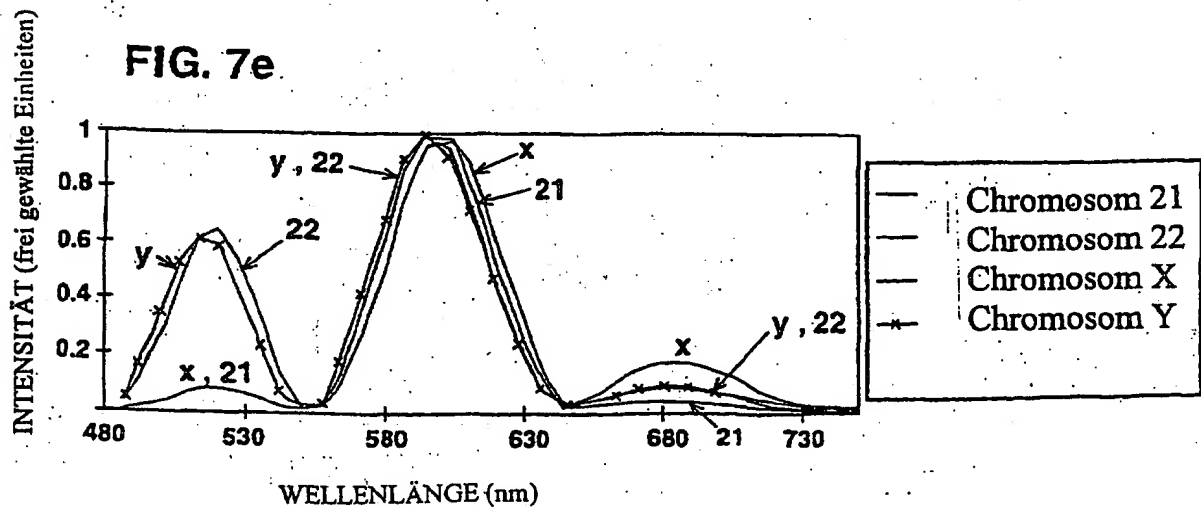


FIG. 8 (a)

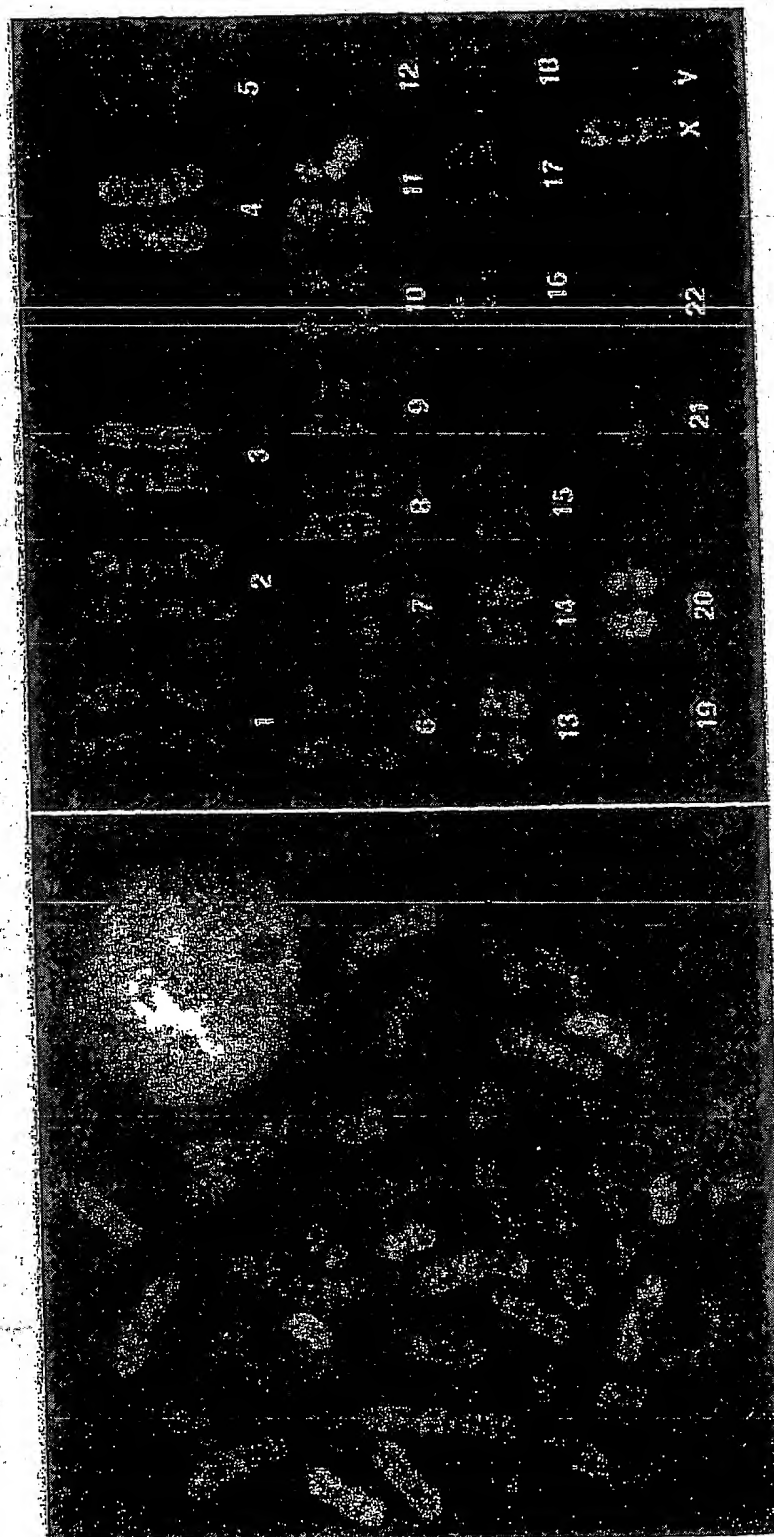


FIG. 8 (b)

DE 295 24 210 U1

29 03 01